

**Entwicklung und Charakterisierung von nasalen Zellkulturmodellen basierend
auf der immortalisierten humanen nasalen Epithelzelllinie RPMI 2650 für In-
vitro-Permeationsuntersuchungen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Annette Julianne Elisabeth Wengst
aus Hannover

1. Referentin:	Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann
2. Referent:	Prof. Dr. Heinz-Georg Schroeder
eingereicht am:	01.07.2013
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.12.2013
Druckjahr 2014	

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Wengst, A., Reichl, S. RPMI 2650 epithelial model and three-dimensional reconstructed human nasal mucosa as in vitro models for nasal permeation studies. Eur J Pharm Biopharm, 74 (2): 290-297 (2010)

Tagungsbeiträge

v. Vietinghoff, A., Reichl, S.: Comparison of suitability of different media supplements for improvement of viability of primary cultured human nasal epithelial cells. (Poster) 6th International Conference and Workshop on Cell Culture and in vitro Models for Drug Absorption and Delivery, Saarbrücken (2006).

v. Vietinghoff, A., Reichl, S.: Influence of media supplements and surface treatments on the viability of human nasal epithelial cells in primary culture. (Poster) 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf (2006).

v. Vietinghoff, A., Reichl, S.: Barrier Properties Of The Immortalized Human Nasal Epithelial Cell Line RPMI 2650. (Vortrag) DPhG Jahrestagung, Erlangen (2007).

v. Vietinghoff, A., Reichl, S.: Coculture of RPMI 2650 cells and human nasal fibroblasts to form a model construct of the human nasal mucosa for drug absorption studies. (Poster) 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona (2008).

Wengst, A., Reichl, S.: RPMI 2650 Zellkulturmodelle der humanen nasalen Mukosa für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsstudien. (Poster) DPhG Jahrestagung, Bonn (2008).

Für Johannes,
Carolina und Frederik

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Anleitung von Frau Professor Dr. Christel C. Müller-Goymann.

Frau Prof. Dr. Müller Goymann

danke ich für die Zuweisung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die freundliche Betreuung.

Herrn PD Dr. Stephan Reichl

möchte ich besonders für die intensive, kompetente und sehr konstruktive Betreuung, vor allem in Fragen der Zellkultur, und seine ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. Heinz-Georg Schroeder von der HNO-Klinik des Klinikums Braunschweig danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens, sowie ihm und Dr. Clemens Schmidt für die gute und zuverlässige Zusammenarbeit bei der Gewinnung von Spendern von Gewebeproben.

Ich danke weiterhin allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Pharmazeutische Technologie für die kollegiale Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und die fachlichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt hier den Kolleginnen und Kollegen aus der Zellkultur, insbesondere Lucia Albrecht, Dagmar Hahne, Ulrike Kruse und Britta Meyer für die zuverlässige Unterstützung und Hilfe in der Zellkultur und an der HPLC.

Der Fleischerei Kleemann in Waggum danke ich für das unkomplizierte Überlassen von Schweinenasen.

Meinem Mann Johannes danke ich für das kritische Lesen dieser Arbeit und ihm und meiner ganzen Familie für die Unterstützung auch in schwierigen Phasen in der Entstehungszeit der Dissertation.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Allgemeiner Teil.....	3
2.1. Die Nase	3
2.1.1. Funktion	3
2.1.2. Anatomie	3
2.2. Die nasale Mukosa.....	4
2.2.1. Respiratorisches Epithel	4
2.2.2. Basalmembran	5
2.2.3. Bindegewebe und Vaskularisierung	5
2.2.4. Permeationswege	5
2.2.5. Aktive Transportmechanismen – Efflux-Transporter	6
2.3. Arzneistoffe und Arzneiformen zur nasalen Applikation	6
2.3.1. Lokale Wirkung	6
2.3.2. Systemische Wirkung.....	7
2.3.3. Voraussetzungen für eine nasale Applikation	8
2.3.4. Quantitative Beschreibung der Arzneistoffpermeation durch die Mukosa	9
2.4. Modelle der nasalen Mukosa	10
2.4.1. Permeationsmodelle	10
2.4.1.1. Exzidiertes humanes Gewebe	11
2.4.1.2. Exzidiertes tierisches Gewebe	11
2.4.1.3. Primärzellen	12
2.4.1.4. Zelllinien.....	15
2.4.2. Weitere Modelle	17
3. Materialien.....	18
3.1. Biologisches Material	18
3.2. Materialien für die Zellkultur	18
4. Methoden	19
4.1. Zellkulturen.....	19
4.1.1. Zellisolierung und Etablierung von Primärkulturen	19
4.1.1.1. Humane nasale Epithelzellen (HNE).....	19
4.1.1.2. Humane nasale Fibroblasten (HNF)	20
4.1.2. Zelllinie RPMI 2650	20

4.1.3.	Kultivierung und Subkultivierung	20
4.1.4.	Beschichtungen der Wachstumsoberflächen	21
4.1.5.	Mikroskopie	21
4.1.6.	Wachstumsverhalten und Vitalität	21
4.1.6.1.	HNE	22
4.1.6.2.	HNF	23
4.1.6.3.	RPMI 2650	23
4.1.7.	Kryokonservierung	23
4.2.	Permeationsmodelle	23
4.2.1.	Exzidiertes Gewebe	23
4.2.1.1.	Präparation	23
4.2.1.2.	Mikroskopie	24
4.2.1.3.	TEER-Messungen	24
4.2.1.4.	Permeationsuntersuchungen	24
4.2.2.	Epitheliale Modelle der nasalen Mukosa	25
4.2.2.1.	Aufbau und Kultivierung der Modelle	25
4.2.2.2.	HNF-Kokulturen	25
4.2.2.3.	Mikroskopie	26
4.2.2.4.	TEER-Messungen	26
4.2.2.5.	Permeationsuntersuchungen	27
4.2.3.	Dreidimensionale Modelle der nasalen Mukosa (Konstrukte)	28
4.2.3.1.	Aufbau und Kultivierung der Modelle	28
4.2.3.2.	Kontraktion der Kollagengele	29
4.2.3.3.	Mikroskopie	30
4.2.3.4.	TEER-Messungen	30
4.2.3.5.	Permeationsuntersuchungen	30
4.2.4.	Quantitative Bestimmung der Markersubstanzen	30
4.2.4.1.	Natrium-Fluorescein, FITC-Dextran 4000 und Rhodamin 123	30
4.2.4.2.	Propranolol-HCl	30
4.3.	Intraindividuelle Schwankungen der Permeationseigenschaften am Beispiel von porcinem Gewebe	31
4.3.1.	Präparation von porcinem Gewebe	31
4.3.2.	Entnahmeorte	32
4.3.3.	TEER-Messungen	32

4.3.4.	Permeationsuntersuchungen	32
4.4.	PCR-Untersuchungen zur mRNA-Expression ausgewählter ABC-Transporter	33
4.4.1.	RNA-Isolierung	33
4.4.1.1.	Zellkulturen	33
4.4.1.2.	Epitheliale Modelle	34
4.4.1.3.	Dreidimensionale Modelle	34
4.4.2.	Reverse Transkription	34
4.4.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
4.4.3.1.	Primer-Design	36
4.4.3.2.	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	36
4.4.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	37
4.5.	Statistik	38
5.	Ergebnisse und Diskussion	39
5.1.	Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der Primärkulturen	39
5.1.1.	Humane nasale Epithelzellen (HNE)	39
5.1.1.1.	Primärkultivierung	39
5.1.1.2.	Subkultivierung	41
5.1.1.3.	Wachstumsverhalten	42
5.1.1.4.	TEER-Messungen	43
5.1.2.	Humane nasale Fibroblasten (HNF)	44
5.1.2.1.	Primärkultivierung	44
5.1.2.2.	Subkultivierung	45
5.1.2.3.	Wachstumsverhalten	46
5.1.2.4.	Kollagenkontraktionsvermögen	48
5.1.3.	Zusammenfassende Diskussion zu Primärkulturen	49
5.2.	Kultivierung und Charakterisierung der Zelllinie RPMI 2650	50
5.2.1.	Kultivierung	50
5.2.2.	Wachstumsverhalten	50
5.3.	Charakterisierung der exzidierten Mukosa	52
5.4.	Aufbau, Kultivierung und Charakterisierung der Permeationsmodelle	53
5.4.1.	Epitheliale Modelle der nasalen Mukosa	53
5.4.2.	Dreidimensionale Modelle der nasalen Mukosa	55
5.4.2.1.	Aufbau und Kultivierung der Modelle	55

5.4.2.2.	Einfluss verschiedener HNF-Chargen, -Zellzahlen und –Passagen auf die Gelkontraktion	55
5.4.2.3.	Mikroskopie	58
5.4.3.	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der Permeationsmodelle	61
5.5.	Transepithelialer elektrischer Widerstand der Permeationsmodelle (TEER)	64
5.5.1.	Exzidiertes humanes Gewebe	64
5.5.2.	Epitheliale Modelle mit RPMI 2650	64
5.5.2.1.	Einfluss von Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze	64
5.5.2.2.	Verlauf über die Zeit	64
5.5.2.3.	Einfluss von Epithelzellzahlen	66
5.5.2.4.	Einfluss von Medienzusätzen und Beschichtungen	66
5.5.2.5.	Einfluss von HNF-Kokultur	69
5.5.3.	Dreidimensionale Modelle	69
5.5.3.1.	Verlauf über die Zeit	69
5.5.3.2.	Einfluss von Zellzahlen	70
5.5.4.	Zusammenfassende Diskussion zu TEER-Messungen an den Modellen	71
5.6.	Permeationsuntersuchungen	74
5.6.1.	Parazelluläre Permeation – Natrium-Fluorescein	74
5.6.1.1.	Exzidiertes humanes Gewebe	74
5.6.1.2.	Epitheliale Modelle	75
5.6.1.3.	Dreidimensionale Modelle	77
5.6.2.	Transzelluläre Permeation – Propranolol-HCl	80
5.6.2.1.	Epitheliale Modelle	80
5.6.2.2.	Dreidimensionale Modelle	81
5.6.3.	Permeation von Makromolekülen – FITC-Dextran 4000	84
5.6.3.1.	Epitheliale Modelle	84
5.6.3.2.	Dreidimensionale Modelle	86
5.6.4.	Zusammenfassende Diskussion zu Permeationsuntersuchungen an den Modellen	86
5.7.	Intraindividuelle Schwankungen der Permeationseigenschaften	90
5.7.1.	Präparation von porcinem Gewebe	90

5.7.2.	TEER-Messungen.....	91
5.7.3.	Permeationsuntersuchungen mit Natrium-Fluorescein	92
5.7.4.	Zusammenfassende Diskussion der intraindividuellen Schwankungen.....	93
5.8.	Charakterisierung der Expression ausgewählter ABC-Transporter	95
5.8.1.	Rhodamin 123-Permeation	95
5.8.1.1.	Epitheliale Modelle mit RPMI 2650	95
5.8.1.2.	Dreidimensionale Modelle.....	97
5.8.2.	PCR-Untersuchungen	99
5.8.2.1.	RNA-Isolierung.....	99
5.8.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion.....	99
5.8.2.2.1.	MDR1 (ABCB1) (pGP)	100
5.8.2.2.2.	MRP1 (ABCC1)	100
5.8.2.2.3.	MRP2 (ABCC2)	100
5.8.2.2.4.	MRP3 (ABCC3)	104
5.8.2.2.5.	MRP4 (ABCC4)	104
5.8.2.2.6.	MRP5 (ABCC5)	104
5.8.2.2.7.	CFTR (ABCC7).....	104
5.8.3.	Zusammenfassende Diskussion der Transporterexpression.....	108
6.	Abschlussdiskussion	111
6.1.	Modelle der nasalen Mukosa	111
6.2.	Entwicklung und Charakterisierung epithelialer und dreidimensionaler Modelle	112
6.3.	Intraindividuelle Schwankungen der Permeation.....	114
7.	Zusammenfassung.....	116
8.	Literaturverzeichnis	119

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding-Cassette
ALI	Air Liquid Interface
bp	Basenpaare
BT	bovine nasale Epithelzellen, bovine turbinate cells
CaCo	Kolonkarzinomzelllinie
CaLu	Lungenkarzinomzelllinie
cDNA	Copy-DNA
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CT	Choleratoxin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
EGF	Epidermal Growth Factor
FD4	FITC-markiertes Dextran, MG 4000
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
HC	Hydrocortison
HNE	Humane nasale Epithelzellen
HNF	Humane nasale Fibroblasten
KRB	Krebs-Ringer-Puffer
LCC	Liquid-Covered Culture, submerse Kultur
MDR	Multi-Drug-Resistance
MEM	Minimum Essential Medium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht
NEAA	Non Essential Amino Acids
NHBE	Normale humane bronchiale Epithelzellen
P_{app}	Permeationskoeffizient
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Polyethylen

pGP	p-Glykoprotein
PTFE	Polytetrafluorethylen
RA	Retinolsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TBE	Humane tracheale und bronchiale Epithelzellen
TEER	Transepithelialer Elektrischer Widerstand
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZO-1	Zonula occludens Isoform 1

1. Einleitung und Problemstellung

Die nasale Mukosa hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten mehr und mehr an Bedeutung für die Applikation von Arzneistoffen gewonnen. Neben relativ kleinen Molekülen wie Triptanen (MW 300) gehören zu den systemisch über die Nasenschleimhaut applizierten Substanzen auch große Peptidmoleküle wie Calcitonin (MW 3421). Bei der Entwicklung und Einführung neuer Arzneistoffe und/oder Arzneiformen zur nasalen Applikation sind pharmakokinetische Studien wie Bioverfügbarkeitsuntersuchungen unerlässlich. Vor präklinischen In-vivo-Studien ist es sinnvoll, mögliche Kandidaten mit Hilfe eines geeigneten In-vitro-Modells zu untersuchen.

Um Transport und Permeation durch die nasale Mukosa zu untersuchen, sind verschiedene In-vitro-Modelle entwickelt worden (Dimova et al., 2005; Forbes und Ehrhardt, 2005; Merkle et al., 1998). Dabei sind drei grundlegende Ansätze möglich: Exzidiertes Gewebe von Tier oder Mensch, humane nasale Epithelzellen (HNE) in Primär- oder Sekundärkultur sowie immortalisierte Epithelzellen. Alle Varianten haben spezielle Vor- und Nachteile.

Exzidiertes Gewebe ist in seinen Eigenschaften den physiologischen Bedingungen am ähnlichsten, jedoch ist die Beschaffung aufwändig, die Vitalität begrenzt, und damit die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen erschwert. Ein direkter Vergleich verschiedener Versuche ist schwer möglich, weil es zum Teil große inter- und auch intraindividuelle Schwankungen der Eigenschaften gibt.

Auch HNE in Primär- und Sekundärkultur zeigen in vieler Hinsicht physiologische Eigenschaften, insbesondere im Hinblick auf Stoffwechselaktivität und Morphologie, wie z. B. Zilienbildung. Sie haben eine etwas längere Lebensdauer, aber auch hier ist die Beschaffung aufwändig, und es treten Schwankungen je nach Spender und zusätzlich je nach Isolierungsmethode und Passagezahl auf.

Immortalisierte Zelllinien haben hier den großen Vorteil, dass ihre Eigenschaften über eine hohe Passagezahl konstant bleiben und sie somit zu einer guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beitragen. Ihr Hauptnachteil ist der Verlust vieler physiologischer Eigenschaften, wie z. B. Zilienbildung, und der Fähigkeit zur vollständigen Differenzierung.

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst, humane nasale Epithelzellen zu isolieren, zu kultivieren und im Hinblick auf ihre Eignung für Permeationsmodelle zu charakterisieren. Als Alternative zu diesem Ansatz sollte zudem die immortalisierte

humane nasale Epithelzelllinie RPMI 2650 untersucht und ihre Eigenschaften und Möglichkeiten zur Verwendung in Permeationsmodellen charakterisiert werden. Besonders stand hierbei zunächst die passive Permeation im Vordergrund. Es sollte untersucht werden, ob ein Modell, basierend auf dieser Zelllinie, ähnliche Permeationseigenschaften wie exzidierte humane Mukosa aufweist. In dieser Arbeit wird die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) als schnelle und einfache Methode verwendet, um die Tight Junction-Funktion von Permeationsmodellen zu testen. Es sollten Markersubstanzen für die parazelluläre (Natrium-Fluorescein) und transzelluläre Permeation (Propranolol-HCl) untersucht werden, zudem ein Stoff mit hohem Molekulargewicht (FITC-markiertes Dextran, MG 4000) und ein Substrat des MDR1-Transporters (Rhodamin 123). Ergänzend sollte dann in den entwickelten Modellen die Expression ausgewählter ABC-Efflux-Transporter für den aktiven, transportervermittelten Efflux untersucht werden.

Ein besonderes Augenmerk sollte zusätzlich auf dem Einfluss von isolierten humanen nasalen Fibroblasten auf die Differenzierung der Epithelzellen liegen. Hierfür wurde sowohl ein kontaktloses als auch ein Modell mit direktem Kontakt zwischen den Zelltypen entwickelt und untersucht.

Schließlich sollte ein Permeationsmodell entwickelt werden, das einfach und reproduzierbar zu kultivieren ist und es schnell und unkompliziert ermöglicht, potentielle Arzneistoffe auf ihre Permeationsfähigkeit durch die nasale Mukosa zu testen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Die Nase

2.1.1. Funktion

Neben der Wahrnehmung von Gerüchen dient die Nase bzw. die Nasenschleimhaut auch zur Reinigung, Befeuchtung und Erwärmung der Atemluft. Durch stetige Schleim- und Flüssigkeitssekretion sowie die gerichtete Zilienbewegung werden kleinere Partikel abgefangen und zum Rachen transportiert, wo sie verschluckt werden. Größere Partikel werden im Nasenvorhof durch längere Haare abgefangen. Durch die relativ große Oberfläche im Nasenraum, die von einem dichten Kapillarnetz feiner Venen unterlagert ist, wird die eingeatmete Luft wesentlich stärker befeuchtet und erwärmt als bei Mundatmung.

2.1.2. Anatomie

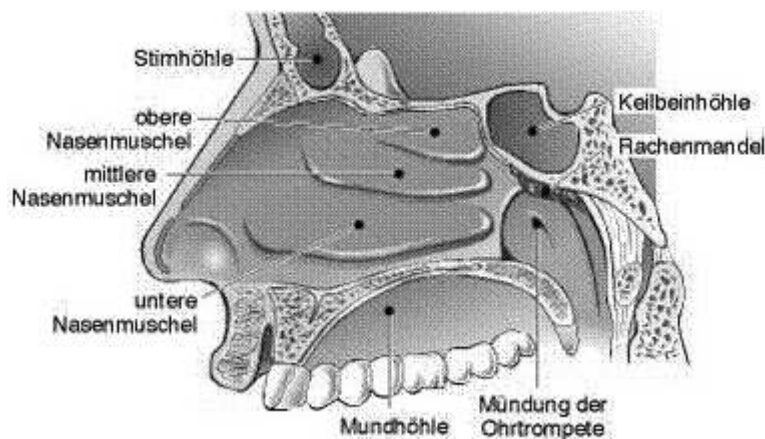


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Nasenhöhle im Längsschnitt (nach: Endres, 2005).

Makroskopisch besteht der Nasenraum aus der äußeren Nase und der Nasenhöhle, die durch die Nasenscheidewand in zwei fast symmetrische Hälften geteilt wird. Jede Hälfte enthält drei Nasenmuscheln (obere, mittlere und untere Nasenmuschel), die aus mit Schleimhaut bedeckten Knochen und Knorpeln bestehen und der Oberflächenvergrößerung dienen (siehe Abbildung 2.1). Die mit der Nasenhöhle verbundenen Nasennebenhöhlen sind ebenfalls mit Schleimhaut bedeckt. Die Nasenhöhle ist von verschiedenen Epithelarten ausgekleidet: Im Vorhof, der der eigentlichen Nasenhöhle und den Muscheln vorgelagert ist, findet sich verhorntes geschichtetes Plattenepithel mit Haaren, das Richtung Innenraum über Plattenepithel

mit dünnerer Hornschicht und geschichtetes hochprismatisches Epithel in respiratorisches Epithel übergeht. Eine Fläche von 140-170 cm² der Nasenmuscheln und der Nasenscheidenwand ist von respiratorischem Epithel bedeckt. Ein relativ kleiner Bereich von ca. 2 mal 2,5 cm² an der oberen Nasenmuschel und am oberen Teil der Nasenscheidewand ist von olfaktorischem Epithel bedeckt (Dahl und Mygind, 1998; Illum, 2003). Aufgrund dieser Oberflächenverhältnisse ist für die Arzneistoffpermeation vor allem das respiratorische Epithel der Nase relevant.

2.2. Die nasale Mukosa

2.2.1. Respiratorisches Epithel

Beim respiratorischen Epithel handelt es sich um ein mehrreihiges hochprismatisches Flimmerepithel, welches in der Nase hauptsächlich aus vier Zelltypen besteht (siehe Abbildung 2.2).

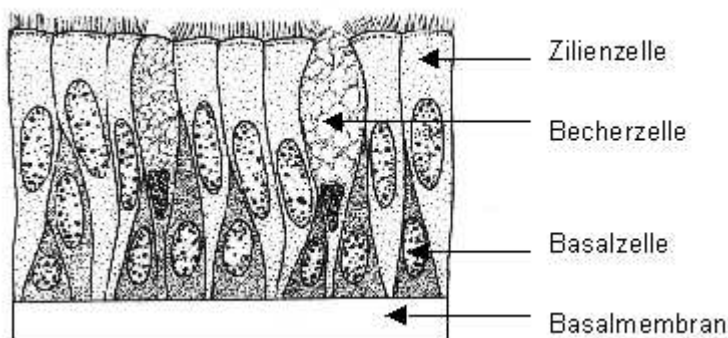


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des nasalen respiratorischen Epithels (nach: Bucher und Wartenberg, 1997).

Kinozilientragende Zellen sind die häufigste Zellart. Sie haben eine kubische bis hochprismatische Form und tragen jeweils 100 bis 300 Zilien pro Zelle, deren Flimmerschlag (ca. 1.000 Schläge/min) Richtung Rachenraum gerichtet ist. Der Anteil der zilientragenden Zellen ist abhängig von der Lage des Epithels. An Orten mit hoher Luftgeschwindigkeit beim Einatmen, die kalter, trockener und verschmutzter Luft ausgesetzt sind, finden sich weniger dieser Zellen (Dahl und Mygind, 1998).

Epithelzellen mit Mikrovilli stellen eine unreife Form der kinozilientragenden Zellen dar. Jede Zelle trägt ca. 300 Mikrovilli, die zur Oberflächenvergrößerung beitragen. Beide genannten Zelltypen sind untereinander apikal durch Tight Junctions verbunden.

Becherzellen enthalten und sezernieren polysaccharidhaltigen Schleim und sind unter anderem in mehrzelligen, endoepithelialen Schleimdrüsen enthalten, die ins Epithel eingesenkt sind. Durchschnittlich finden sich 4.000 bis 7.000 Becherzellen/mm², wobei der Anteil im hinteren Bereich der Nasenhöhle höher ist als im vorderen. Es ist beschrieben worden, dass im Bereich gefüllter Becherzellen die Dichtigkeit der Tight Junctions gestört sein kann, was für die Permeation und Absorption von Arzneistoffen von Bedeutung ist (Carson et al., 1987; Inagaki et al., 1985).

Basalzellen sind kleine runde Zellen, die auf der Basalmembran aufsitzen, ohne die Oberfläche des Epithels zu erreichen. Sie gelten als Vorläuferzellen, die sich weiter teilen und zu jeder der anderen Zellarten weiterentwickeln können. Zudem nimmt man an, dass sie die Bindung der hochprismatischen Zellen an die Basalmembran verstärken.

2.2.2. Basalmembran

Die Basalmembran, auf der die Epithelzellschicht aufsitzt, besteht aus Kollagenfibrillen und verschiedenen Struktur-Glykoproteinen wie Laminin, Fibronectin und anderen. Sie erfüllt eine wichtige Stütz- und Verankerungsfunktion.

2.2.3. Bindegewebe und Vaskularisierung

Unterhalb der Basalmembran findet sich die Lamina propria, eine dünne Bindegewebsschicht, die reich an Blutgefäßen ist. Die Permeabilität dieser Kapillaren vom fenestrierten Typ ist relativ hoch. Größere venöse Gefäße dienen vor allem zur Erwärmung und Befeuchtung der Atemluft.

2.2.4. Permeationswege

In der nasalen Mukosa sind grundsätzlich die gleichen Permeationswege möglich wie an anderen Epithelien auch. Hydrophile Stoffe permeieren eher parazellulär, also zwischen den Zellen, wobei die Tight Junctions zwischen den Epithelzellen die größten Hindernisse darstellen. Diese sind jedoch in der nasalen Mukosa weniger stark ausgeprägt als beispielsweise im Darmepithel oder an der Blut-Hirn-Schranke. Lipophile Stoffe permeieren eher transzellulär, das heißt, sie werden in die Zelle aufgenommen und treten auf der anderen Seite des Epithels wieder aus. Zusätzlich zu diesen rein passiven Permeationswegen bestehen auch in der nasalen Mukosa Möglichkeiten des aktiven Transports durch Efflux-Transporter.

2.2.5. Aktive Transportmechanismen – Efflux-Transporter

Zu den aktiven Transportmechanismen gehören energieverbrauchende Vorgänge an Transportsystemen. Die wichtigste Familie sind die ABC-Transporter (**A**TP-**B**inding-**C**assette). Die offizielle Nomenklatur orientiert sich am Aufbau der ATP-Bindungsstelle. Viele dieser Efflux-Transporter sind aber vor allem unter ihren älteren Bezeichnungen bekannt. Der erste charakterisierte ABC-Transporter ist ABCB1, vor allem bekannt als MDR1 (**M**ulti-**D**rug-**R**esistance) bzw. p-Glykoprotein. Er hat eine entscheidende Rolle an der Blut-Hirn-Schranke und in der Leber, wurde aber zuerst in Krebszellen gefunden (Juliano und Ling, 1976; Kartner et al., 1983; Riordan et al., 1985). Eine weitere wichtige Unterfamilie ist die ABCC-Familie, zu der MRP-Transporter (**M**ulti-**D**rug-**R**esistance-**R**elated **P**rotein) und der CFTR-Chlorid-Kanal (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **C**onductance **R**egulator) gehören. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Cystischen Fibrose (Mukoviszidose). Wird CFTR vermindert gebildet, so wird weniger Chlorid ins Sekret ausgeschieden. Die Folge ist ein wasserarmes, zähes Sekret, das die Atemwege verschließen kann. Aufgrund seiner Bedeutung ist dieser Transporter sehr gut untersucht. In der vorliegenden Arbeit werden die Abkürzungen MDR, MRP und CFTR verwendet. In der humanen nasalen Mukosa werden verschiedene Transporter exprimiert, darunter einige Subtypen des MRP (ABCC1, 4, 5) sowie der CFTR-Transporter (ABCC7) (Henriksson et al., 1997; Hurbain et al., 2003; Wioland et al., 2000).

2.3. Arzneistoffe und Arzneiformen zur nasalen Applikation

2.3.1. Lokale Wirkung

Lokal wirksame Arzneimittel zur nasalen Anwendung enthalten vor allem Glucocorticoide (z. B. Budesonid, Dexamethason, Fluticasonpropionat) zur Behandlung und Vorbeugung von Rhinitis, α -Sympathomimetika (z. B. Xylometazolinhydrochlorid) zur Vasokonstriktion und damit abschwellenden Wirkung bei Schnupfen und/oder Dexpanthenol zur Wundheilungsförderung. Diese Wirkstoffe werden neben ihrer lokalen Wirkung aber auch, wenn auch in sehr geringen Mengen, systemisch aufgenommen. Daher dürfen α -Sympathomimetika z. B. bei schweren organischen Herz- und Gefäßveränderungen auch nasal nicht angewendet werden. Auch die Untersuchung dieser lokal wirksamen Stoffe im Hinblick auf ihre Permeation und systemische Verfügbarkeit ist daher sinnvoll und wichtig.

2.3.2. Systemische Wirkung

Für die systemische Wirkung von Arzneistoffen hat die nasale Mukosa als Applikationsort aufgrund einiger Vorteile in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Verglichen mit dem gastrointestinalen Epithel oder dem Stratum corneum der Haut findet man ein deutlich durchlässigeres Epithel, das sehr gut durchblutet ist und damit permeierte Stoffe direkt in den systemischen Kreislauf zur Verfügung stellt, wobei der First-Pass-Effekt umgangen wird. Hierdurch tritt die Wirkung schneller ein als bei peroraler oder transdermaler Aufnahme. Die zur Verfügung stehende Oberfläche ist durch zahlreiche Mikrovilli nochmals vergrößert. Gegenüber der parenteralen Applikation hat die nasale Route den Vorteil, dass der Patient sich einfach und ohne Injektionen das Arzneimittel selbst applizieren kann, was eine große Bedeutung für die Compliance des Patienten hat (Costantino et al., 2007; Ugwoke et al., 2001)

Zu den Substanzen, die bereits für die nasale Applikation auf dem Markt sind, gehören neben kleinen Molekülen wie Triptanen (z. B. Sumatriptan, MW 295) auch größere Peptidmoleküle wie Calcitonin (MW 3421). Die Entwicklung einer nicht-invasiven Darreichungsform für Moleküle mit hohem Molekulargewicht stellt eine besondere Herausforderung dar, weil oberhalb von einem Molekulargewicht von 1000 Da die Bioverfügbarkeit ohne Zusatz von Enhancern rapide abfällt. Bei Absorption durch die nasale Mukosa kann zumeist eine höhere Bioverfügbarkeit durch den Zusatz von Permeationsenhancern erreicht werden. (Costantino et al., 2007; Donovan et al., 1990; Turker et al., 2004). Besonders intensiv sind die Bemühungen, eine nasale Applikationsform für Insulin zu entwickeln (MW ca. 5800). Einen Überblick über Probleme und verschiedene Strategien zur Permeationsverbesserung für nasal appliziertes Insulin gibt Duan (Duan und Mao, 2010).

Die Bedeutung der nasalen Route ist in den letzten Jahren angestiegen, was sich leicht an der Anzahl der zugelassenen Arzneimittel zur nasalen Applikation ablesen lässt. 1998 veröffentlichten Behl et al. eine Liste der Produkte auf dem US-Markt, die 14 verschreibungspflichtige und 33 OTC-Produkte umfasste. Hiervon waren aber nur 5 Substanzen (6 Präparate) für eine systemische Wirkung bestimmt (Behl et al., 1998). Daneben waren gleichzeitig 46 Stoffe in der Prüfung auf nasale Applizierbarkeit. 2011 führt die Rote Liste 9 Substanzen in Präparaten für systemische Wirkungen auf. Hierzu gehören Desmopressin, Protirelin, Buserelin,

Calcitonin, Gonadorelin, Nafarelin, Sumatriptan, Zolmitriptan und seit 2009 Fentanyl. Daneben finden sich zahlreiche Produkte mit lokaler Wirkung. Costantino et al. geben eine Übersicht über systemisch wirkende Arzneistoffgruppen, die zum Teil bereits als intranasale Applikationsform zugelassen sind oder sich in der Erprobungsphase befinden. Diskutiert werden hier u. a. Opioide, Triptane, Acetylcholinesterase-Hemmstoffe, Apomorphin, Metoclopramid, Scopolamin, Propranolol und Nifedipin. Weitere Möglichkeiten werden für Naloxon, Benzodiazepine und Glucagon als Notfallmedikationen aufgezeigt (Costantino et al., 2007).

2.3.3. Voraussetzungen für eine nasale Applikation

Ist eine nasale Applikation angestrebt, müssen die Substanz wie auch die Darreichungsform einige Voraussetzungen erfüllen (Agu und Ugwoke, 2008; Behl et al., 1998; Costantino et al., 2007; Illum, 2003). Um einen Wirkstoff gezielt auf der nasalen Mukosa applizieren zu können, muss er zunächst in eine geeignete Formulierung eingearbeitet werden. Hierfür muss er eine hohe Wasserlöslichkeit besitzen bzw. in einem flüssigen System löslich sein, das die Nasenschleimhaut nicht reizt oder schädigt. Auch der Wirkstoff selber muss auf Toxizität, z. B. in Hinsicht auf die Zilienaktivität, getestet werden. Stoffe mit unangenehmem Geruch bzw. Geschmack sind für eine nasale Applikation nicht geeignet. Eine Dosis sollte in einem Volumen von maximal 200 µl zu applizieren sein, weil größere Volumina nach der Applikation aus der Nasenhöhle herauslaufen, zum Teil auch in den Rachenraum. Ist der Stoff nicht ausreichend löslich, kommt es zu einer verminderten Absorption, weil die Feststoffpartikel, sei es als Pulver oder als Suspension, innerhalb kurzer Zeit durch die Zilienbewegung aus der Nase in den Rachen abtransportiert werden. So käme es allenfalls zu einer oralen Aufnahme.

Das Molekulargewicht des zu applizierenden Stoffes spielt für die Bioverfügbarkeit eine entscheidende Rolle. Diverse Studien belegen ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen Molekulargewicht und nasaler Absorption (Donovan et al., 1990; Fisher et al., 1987; Huang und Donovan, 1998; Kissel und Werner, 1998; Yamamoto et al., 2001).

Im Hinblick auf den Permeationsweg eines Stoffes spielt auch der Verteilungskoeffizient bzw. die Lipophilie des Stoffes eine Rolle. Bei Säuren und Basen ist es wiederum abhängig vom pK_a -Wert, ob sie bei der Applikation dissoziiert vorliegen. Insbesondere für schwache Elektrolyte ist daher der pH-Wert wichtig, der

auf der Nasenschleimhaut ca. 5,5-6,5 beträgt und bei Rhinitis auf bis zu 8,3 ansteigt (England et al., 1999). Durch die Zusammensetzung der Arzneiform lässt sich der pH-Wert kurzzeitig verändern. Dies ist jedoch nur in engen Grenzen möglich, da eine zu starke pH-Verschiebung die Epithelzellen schädigen und Reizungen hervorrufen kann.

Um die Permeationseigenschaften eines Stoffes zu beeinflussen, ist die Entwicklung eines geeigneten Trägersystems von entscheidender Bedeutung. Einfache technologische Möglichkeiten sind Lösungen, Suspensionen (entscheidend ist hier die Partikelgröße), Pulver und halbfeste Zubereitungen wie Cremes. Weitere Formen sind komplexere Systeme wie Liposomen oder Nanopartikel. Zusätze zur Einstellung von pH, Osmolarität, Viskosität, Konservierung usw. können die Darreichungsform weitgehend auf die Bedürfnisse des Arzneistoffes abstimmen. Permeationenhancer können die Absorption auch von großen Molekülen deutlich verbessern und wurden bereits eingehend untersucht. Ihre Wirkung geht auf verschiedene Mechanismen zurück: Sie können die Viskosität der Mukusschicht verringern, die Zilienaktivität hemmen, die Fluidität der Membrandoppelschicht der Zellen verändern, die Dichtigkeit der Tight Junctions herabsetzen oder die Peptidaseaktivität hemmen (Ugwoke et al., 2001). Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von mukoadhäsiven Stoffen, die die Verweildauer auf der Nasenschleimhaut verlängern. Wichtig ist für den Einsatz dieser Enhancer, dass ihre Effekte vorübergehend und vollständig reversibel sind, besonders bei chronischem Gebrauch. Muranishi teilt daher die Permeationenhancer in vier Gruppen ein, die ihre Sicherheit widerspiegeln. Zu den relativ sicheren Stoffen gehören demnach verschiedene Fettsäuren und Gallensalze, ungeeignet sind z. B. DMSO oder Ethanol (Muranishi, 1990). Zahlreiche weitere Veröffentlichungen beschäftigen sich mit diesem Thema (Di Colo et al., 2008; Karasulu et al., 2008; Lee et al., 1991).

Ein weiterer Aspekt ist der genaue Applikationsort in der Nase. Die verschiedenen Zelltypen der Mukosa sind, wie erwähnt, nicht gleichmäßig in der gesamten Nasenhöhle verteilt. Im vorderen Bereich findet man zudem auch verhorntes Epithel. Generell ist die Absorption im hinteren Bereich meist größer, wobei hier aber die Verweilzeit aufgrund höherer ziliärer Clearance kleiner ist (Behl et al., 1998).

2.3.4. Quantitative Beschreibung der Arzneistoffpermeation durch die Mukosa

Zur Quantifizierung von In-vitro-Permeationsuntersuchungen können der Arzneistoffflux J und der Permeationskoeffizient berechnet werden. Diese ergeben

sich aus der permeierten Arzneistoffmenge pro Zeit- und Flächeneinheit (Flynn et al., 1974). Setzt man perfect sink-Bedingungen und eine annähernde Konstanz der Donorkonzentration des untersuchten Stoffes voraus, so lässt sich der Flux folgendermaßen beschreiben:

$$J = P_{app} \cdot c_0$$

$$J = \text{Flux [g/(cm}^2\text{s)]}$$

$$c_0 = \text{Konzentration des gelösten Stoffes im Donor [g/cm}^3\text{]}$$

$$P_{app} = \text{Permeationskoeffizient [cm/s]}$$

Perfect sink-Bedingungen erreicht man, indem man die Konzentration des untersuchten Stoffes im Akzeptor unterhalb von 10 % der Sättigungskonzentration hält.

Stellt man die Ergebnisse einer Permeationsuntersuchung graphisch dar, indem man die permeierte Menge gegen die Zeit aufträgt, so lässt sich im steady-state-Bereich, also dem linearen Bereich des Graphen, die Steigung dQ/dt [g/s] ablesen. Bezieht man diese auf die Permeationsfläche A , so erhält man den Flux J [g/cm²s]. Unter Berücksichtigung der Ausgangskonzentration im Donor [g/cm³] erhält man den Permeationskoeffizienten P_{app} [cm/s]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt \cdot c_0 \cdot A} = J / c_0$$

2.4. Modelle der nasalen Mukosa

2.4.1. Permeationsmodelle

Als Permeationsmodelle werden grundsätzlich drei verschiedene Systeme verwendet: Erstens exzidiertes Gewebe, entweder humanen oder tierischen Ursprungs, zweitens isolierte humane nasale Epithelzellen (HNE) in Primär- oder Sekundärkultur und drittens immortalisierte Zelllinien (Dimova et al., 2005; Forbes und Ehrhardt, 2005; Merkle et al., 1998).

Die Modelle können über verschiedene Methoden verglichen werden: Zum einen durch die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) (Koch et

al., 2002) (siehe 4.2.1.3), zum anderen über die Permeationsgeschwindigkeit verschiedener Markersubstanzen, wie z.B. Natrium-Fluorescein als parazellulär permeierender Stoff.

2.4.1.1. Exzidiertes humanes Gewebe

Exzidiertes humanes Gewebe wurde bis heute vergleichsweise selten für Permeationsuntersuchungen verwendet. Die Verfügbarkeit ist weitaus geringer als die von tierischem Gewebe, auch die Ausbeute je Spende ist wesentlich kleiner. Cho et al. verwendeten humanes Gewebe für Untersuchungen zum Protonenfluss bei gesunden und Asthma-Patienten (Cho et al., 2009). Eine Untersuchung zur Effektivität der Behandlung der Schlafapnoe verwendete ebenfalls exzidiertes humanes Gewebe lebender Patienten (Constantinidis et al., 2000). Für Permeationsuntersuchungen und Toxizitätsbestimmungen von verschiedenen nasalen Arzneiformen mit Sandostatin verwendeten de Fraissinette et al. humane nasale Mukosa (de Fraissinette et al., 1995b).

2.4.1.2. Exzidiertes tierisches Gewebe

Exzidiertes tierisches Gewebe kann relativ einfach und regelmäßig in gleichbleibender Qualität von Schlachtbetrieben bezogen werden und ist daher in vielen Untersuchungen verwendet und beschrieben worden. Ein Problem kann der Unterschied zwischen den Spezies darstellen, z. B. in der Enzymaktivität oder in der Verteilung der Zelltypen. Kaninchen-, Rinder und Schweinegewebe sind jedoch in zahlreichen Studien zur Permeation und zu Permeationsenhancern untersucht worden, und auch die Korrelation mit humanem Gewebe wurde bestätigt.

Kubo et al. zeigten an Kaninchenmukosa den permeationsfördernden Effekt verschiedener Gallensalze auf Modellstoffe verschiedener Größe (Kubo et al., 1994), Uchida et al. verwendeten ebenfalls Kaninchenmukosa für Untersuchungen zur Permeationsförderung von Insulin durch verschiedene Gallensalze (Uchida, 1991). Im Jahr 2000 beschrieben Schmidt et al. bovine nasale Mukosa als geeignetes Modell für Permeationsstudien, auch mit Permeationsenhancern, und Metabolisierungsuntersuchungen von Peptiden (Schmidt et al., 2000). 2003 verglichen Wadell et al. Permeationsdaten von exzidierter porciner Mukosa mit Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen. Sie fanden eine schwache Korrelation, wobei sie für rein passiv permeierende Stoffe wesentlich höher war als für Stoffe, die auch durch carrier-vermittelten Transport oder Efflux beeinflusst werden (Wadell et

al., 2003). Die Expression entsprechender Proteine kann zwischen den Spezies stark schwanken (Warren et al., 2009).

Auch Untersuchungen zu TEER-Werten sind an verschiedenem tierischen Gewebe durchgeführt worden. Für porcine Mukosa findet man Werte von ca. $70 \Omega \cdot \text{cm}^2$, für bovine Mukosa $42 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Schmidt et al., 2000; Wadell et al., 1999).

2.4.1.3. Primärzellen

Eine zweite Möglichkeit, Permeationsmodelle zu entwickeln, ist die Verwendung von humanen nasalen Epithelzellen (HNE) in Primär- oder Sekundärkultur. HNE werden aus exzidiertem Gewebe isoliert und können laut Literaturangaben über bis zu vier Passagen kultiviert werden, ohne ihre organotypischen Eigenschaften zu verlieren (Yoo et al., 2003).

Zur Gewinnung aus humaner nasaler Mukosa werden verschiedene Verfahren beschrieben (Merkle et al., 1998), wobei die meisten dieser Verfahren traumatische Methoden (z. B. Turbinektomie, Polypektomie oder gar Autopsie) und daher nicht wiederholbar sind. Dies ist wohl der wichtigste Nachteil der HNE-Modelle. Primärkulturen und Kulturen über wenige Passagen sind abhängig von wiederholter Proben- bzw. Zellentnahme. Dies ist jedoch beim selben Spender in derselben Schleimhautregion kaum möglich. Abhilfe können hier atraumatische Methoden schaffen (z. B. das Abkratzen, Abbürsten oder Auswaschen der Zellen), hier ist jedoch die Ausbeute meist geringer.

Die Isolierung dieser Primärzellen ist aufwändig, und die Lebensdauer der gewonnenen Zellen ist sehr begrenzt. Hinzu kommen inter- und intraindividuelle Unterschiede zwischen den Spendern bzw. Spenden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die verschiedenen Zelltypen der nasalen Mukosa. Epithelzellen mit und ohne Zilien, Becherzellen und Basalzellen verhalten sich in Primärkultur unterschiedlich. Ihr Anheftungsvermögen und ihr Wachstum variieren beträchtlich. Es wurde beschrieben, dass in Kulturen nasaler Epithelzellen von Mäusen nach drei Wochen Kultur keine Becherzellen mehr gefunden werden konnten (Grubb et al., 2006). Die Kultur wird daher die verschiedenen Zelltypen nicht in dem Verhältnis aufweisen wie das Epithel in vivo. Dies ist deswegen von Bedeutung, weil z. B. gefüllte Becherzellen zu Fehlstellen in der Zonula Occludens der Tight Junctions führen können (Carson et al., 1987; Dahl und Mygind, 1998; Inagaki et al., 1985). Dies legt das Vorhandensein permeablerer Gebiete zwischen

den Epithelzellen im physiologischen Epithel nahe. Können nun Becherzellen beim Anlegen von Primärkulturen weniger gut und schnell anwachsen und sich ausdifferenzieren, findet so eine selektive Isolierung von Tight Junction-bildenden Epithelzellen statt. Dies könnte zu einer sehr viel dichteren Barriere führen, als es in vivo der Fall ist. Weitere Faktoren, die in vivo die Permeabilität der Mukosa erhöhen, sind Entzündungsprozesse und allergische Reaktionen. Durch Entzündungen wird die Dichtigkeit der Tight Junctions reversibel herabgesetzt.

Aus diesen Gründen ist die Eignung von isolierten nasalen Epithelzellen als Permeationsmodell kritisch zu sehen. Nichtsdestotrotz gibt es seit fast 50 Jahren zahlreiche Untersuchungen mit primären humanen nasalen und tracheobronchialen Epithelzellen. Bereits 1966 wurden HNE durch Auswachsen aus exzidiertem Epithel gewonnen (Sakakura, 1966). In dieser Studie wurde vor allem die zilientragende Zelle betrachtet, im Hinblick auf Zilienaktivität und mitotische Fähigkeiten. Allgemein wuchsen Epithelzellen aus dem Gewebe aus, konnten jedoch ohne Subkultivierung nicht länger als 10-14 Tage erhalten werden.

Wiesel et al. berichteten Ähnliches, wobei auch hier die Explantate auf extrazellulärer Matrix kultiviert wurden. Dies schien für die Anheftung und das Auswachsen der Epithelzellen entscheidend zu sein. Bemerkenswerterweise war auf extrazellulärer Matrix kaum Fibroblastenwachstum zu beobachten, obwohl diese in vielen anderen Kulturen durch schnelleres Wachstum die Epithelzellen überwucherten (Wiesel et al., 1983).

1985 untersuchten Steele und Arnold die Eignung verschiedener Isolierungsmethoden, Wachstumsoberflächen und Medien für die Gewinnung und Kultivierung nasaler Epithelzellen von Ratte, Kaninchen und vom Menschen. Zur Gewinnung möglichst vieler Zellen empfahlen sie die Explantat-Technik für humanes Gewebe. Die Anheftung war bei kollagenbeschichteter Oberfläche deutlich besser als bei unbeschichtetem Glas/Plastik (Polystyrol). Als förderlich erwiesen sich Medienzusätze von Insulin, Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Choleratoxin, Transferrin und Hydrocortison, während Serum durch bovinen Hypothalamusextrakt ersetzt werden sollte (Steele und Arnold, 1985).

In späteren Studien wurden oftmals Zellen eingesetzt, die durch enzymatische Dissoziation gewonnen wurden. Werner und Kissel isolierten die Epithelzellen mittels Protease und konnten sie in einem relativ einfachen Wachstumsmedium auf unbeschichteter Plastikoberfläche kultivieren. Ein Zusatz von Wachstumsfaktoren

zeigte hier keine Verbesserung der Zellvitalität. Sie führten Untersuchungen zur Amino-peptidaseaktivität und zur Permeation von Modellstoffen durch. Die Permeations- und Metabolisierungsdaten waren Werten für Rattennasenepithel vergleichbar (Werner und Kissel, 1995).

In einer Folgearbeit untersuchte die Arbeitsgruppe vergleichend Primärkulturen und die Zelllinien RPMI 2650 (humane nasale Epithelzellen) und BT (bovine nasale Epithelzellen, bovine turbinate cells) im Hinblick auf ihre histochemischen und morphologischen Eigenschaften (Werner und Kissel, 1996). Sie fanden nur bei den Primärkulturen schleimenthaltende Becherzellen. Über eine Actin-Färbung wiesen sie Zellskelett und Tight Junctions nach, die sich vor allem bei den Primärkulturen zeigten, aber auch bei der Zelllinie RPMI 2650. Letztere konnte aber keinen konfluenten Monolayer bilden, so dass ihre TEER-Werte weit unter denen der Primärkulturen lagen. Als Schlussfolgerung wurde nur die Primärkultur als geeignet für Transportstudien eingestuft.

Gray et al. untersuchten 1996 die Differenzierungsmöglichkeiten von normalen humanen tracheobronchialen Epithelzellen, die außerdem möglichst lange in Kultur gehalten werden sollten (Gray et al., 1996). Die Zellen wuchsen bis zur Passage 5 schnell weiter, ab Passage 6 war nur noch schwaches Wachstum zu beobachten. In Kulturen an der Luft-Medium-Grenze wurde die Mucin-Produktion sowie die Zilienbildung beobachtet. Letztere setzte etwa nach 18 Tagen in Kultur ein. Besonders wichtig für die Differenzierung der Zellen schien Retinolsäure zu sein. Kulturen mit Retinolsäure zeigten zwar insgesamt kleinere Zellzahlen, enthielten aber mehr schleimproduzierende und zilientragende Zellen. Der Gehalt an EGF im Medium hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Differenzierung. Ein zu hoher Gehalt führte zu schlechterem Zellwachstum und fehlender Ausbildung eines säulenartigen Epithels, während eine Konzentration von 0,5 ng/ml eine gleichförmigere Morphologie des Epithels bewirkte, die den Verhältnissen in vivo ähnlicher war. Entscheidend schien auch in dieser Untersuchung die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze zu sein. In einer Folgearbeit (Yoon et al., 1997) dieser Arbeitsgruppe wurden weiter die Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Mukus-Sekretion der Zellen untersucht. Insbesondere Retinolsäure hatte einen positiven Einfluss auf die Menge und Zusammensetzung des Sekrets, Triiodthyronin und Kollagengel als Wachstumsoberfläche führten zu einer verringerten Mukus-Sekretion.

Ebenfalls an der Luft-Medium-Grenze führten Schmidt et al. ihre Untersuchungen zur Toxizität von Schmutzpartikeln der Luft an HNE durch und bestimmten die enzymatische Reaktion der Zellen (Schmidt et al., 1996). Sie verwendeten Primärkulturen, die wie vorher bei Werner und Kissel 1995 beschrieben durch enzymatische Dissoziation mit Protease gewonnen wurden. Im Gegensatz zur submersen Kultur bildeten sich an der Luft-Medium-Grenze zilientragende Zellen aus.

Agu et al. untersuchten 2001 verschiedene Kollagenarten als Wachstumssubstrat für HNE (Agu et al., 2001). Sie charakterisierten Zilienaktivität, TEER, parazelluläre Permeation und die Aktivität von mitochondrialer Dehydrogenase (MTT-Test zur Bestimmung der Viabilität) sowie Lactatdehydrogenase (für Toxizitätsmessungen). Je nach physikalischen Eigenschaften des Kollagens bewerteten sie die Modelle als geeignet für Permeationsuntersuchungen bzw. Metabolisierungs- oder Toxizitäts-Studien.

Yeh et al. untersuchten insbesondere den Unterschied zwischen submerser und ALI-Kultur und fanden bei letzterer eine deutlich bessere Differenzierung. Sie beobachteten vermehrte Zilienbildung und Expression von Gap Junction-Proteinen wie Connexin (Yeh et al., 2007).

In den vergangenen Jahren sind HNE für verschiedene Untersuchungen eingesetzt worden. So testeten Mallants et al. die Ziliotoxizität von Konservierungsmitteln, Koizumi et al. die Ausbildung von Gap Junctions und Tight Junctions bei Kokultur mit humanen nasalen Fibroblasten (HNF), Lin et al. untersuchten den Einfluss von oberflächenaktiven Stoffen auf TEER und Permeabilität, und Cho et al. verwendeten sie für Permeationsstudien mit Mikropartikeln (Cho et al., 2010; Koizumi et al., 2007; Lin et al., 2007b; Mallants et al., 2007).

2.4.1.4. Zelllinien

Der dritte Ansatz ist die Verwendung immortalisierter Zelllinien, die die grundlegenden Vorteile von Homogenität und Reproduzierbarkeit zeigen. Eine kommerziell erhältliche Möglichkeit ist hier das Modell EpiAirwayTM, ein Gewebemodell des Respirationstrakts. Es besteht aus humanen trachealen (NHBE) oder bronchialen (TBE) Epithelzellen und wurde bereits für In-vitro-Untersuchungen nasaler Bioverfügbarkeit eingesetzt (Agu et al., 2004; Chen et al., 2006; Leonard et al., 2005). Es bildet ein mehrreihiges zilientragendes Epithel mit TEER-Werten von ca. 550 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (MatTek, 11/2008). Diese Werte kommen den Werten von

tracheobronchialen Epithel sehr nahe, während nasales respiratorisches Epithel weit niedrigere TEER-Werte aufweist (Cotton et al., 1987; Wadell et al., 1999).

Eine in Zellbanken etablierte immortalisierte Zelllinie aus humanen nasalen Epithelzellen ist die Zelllinie RPMI 2650. Die Zelllinie RPMI 2650 wurde 1962 aus einem Plattenepithelkarzinom der Nasenscheidewand gewonnen (Moore und Sandberg, 1964). Moll et al. fanden, dass die Zelllinie ein ähnliches Cytokeratinmuster exprimiert wie das normale humane nasale Epithelium (Moll et al., 1983). Die Zelllinie ist lange als nicht geeignet für In-vitro-Permeationsuntersuchungen beschrieben worden. Eine Untersuchung im Jahr 1995 zeigte, dass die Zellen abhängig von ihrer Kultivierung Cluster bilden oder sich über die Kulturfläche ausbreiten. Eine Polarisierung war nicht zu erkennen, ebenso wenig Zilienbildung. Tight Junctions waren ebenso nicht nachzuweisen (De Fraissinette et al., 1995a). De Fraissinette et al. schlossen daraus, dass diese Zelllinie kein geeignetes Permeationsmodell darstellt, weil sie nicht differenziert und keinen konfluenten Monolayer bildet.

Auch in späteren Untersuchungen zeigten RPMI 2650-Zellen im Gegensatz zu isolierten humanen nasalen Epithelzellen kein konfluentes Wachstum, sondern Kolonie- und Clusterbildung und Wachstum in mehrschichtigen „Haufen“. Aufgrund dieses Musters konnte auch keine Erhöhung des TEER-Wertes gemessen werden. Eine Differenzierung zu Becherzellen oder zilientragenden Zellen war nicht zu beobachten. Aus diesem Grund wurde eine Eignung der Zellen für Permeationsstudien ausgeschlossen (Werner und Kissel, 1996).

Im Gegensatz dazu sprach Peter ihnen eine Eignung für Metabolismusstudien sowie Potential für Permeationsuntersuchungen zu. Diese Untersuchung zur Metabolisierungskapazität der Zelllinie und zur Charakterisierung verschiedener Enzyme zur Peptid-Biotransformation zeigte große Ähnlichkeit zu In-vivo-Verhältnissen (Peter, 1996). Andere Untersuchungen fanden eine vergleichbare enzymatische Barriere wie in exzidiertem humanen Nasenepithel. Auch konnte hier ein TEER-Wert ($114 \Omega \cdot \text{cm}^2$) beobachtet werden, der in einem ähnlichen Bereich lag wie bei exzidiertem Gewebe ($88 \Omega \cdot \text{cm}^2$), jedoch keine Polarisierung (Cotton et al., 1987; Merkle et al., 1998).

Für die Charakterisierung der Reaktion epithelialer Zellen auf Allergene bzw. Zytokine und die Ausschüttung von TGF-beta wurde die Zelllinie bereits erfolgreich verwendet (Salib et al., 2005). Andere Studien verwendeten RPMI 2650 für

Permeationsstudien mit mukoadhäsiven Microsphaeren (Harikarnpakdee et al., 2006). Hierfür wurden Zellen in submerser Kultur verwendet, die eine Permeationsbarriere für FITC-markiertes Dextran (MW 4000, FD4) bildeten und Permeationsunterschiede zwischen den Formulierungen deutlich sichtbar machten. Ein Vergleich mit nasaler Mukosa fehlt hier jedoch.

Eine neue Studie von Bai et al. beschreibt im Gegensatz zu früheren Ergebnissen, dass RPMI 2650 in der Lage sind, einen konfluenten Monolayer zu bilden und geeignete TEER-Werte sowie Permeationsbarrieren zu entwickeln, wenn sie an der Luft-Medium-Grenze kultiviert werden. Unter diesen Bedingungen bilden die Zellen auch Tight Junction-Proteine wie ZO-1, Occludin und Claudin-1 (Bai et al., 2008).

Eine weitere Zelllinie sind BT-Zellen, die aus bovinem nasalem Epithel der Nasenmuscheln gewonnen worden sind. Sie wurden vor allem für Untersuchungen zur Virusempfindlichkeit und –vermehrung genutzt, scheinen aber auch eine ähnliche Enzymaktivität wie humane nasale Mukosa zu besitzen (Werner und Kissel, 1996). In dieser Untersuchung wurden auch diese Zellen als nicht geeignet für Permeationsuntersuchungen charakterisiert.

2.4.2. Weitere Modelle

Die nasale Mukosa ist neben der Permeationsbarriere durch das Epithel auch eine metabolische Barriere durch Enzymaktivität. Um diese zu charakterisieren bzw. Modelle im Hinblick darauf zu untersuchen, wurden ebenfalls zahlreiche Studien durchgeführt. Bereits 1996 (Schmidt et al., 1996) wurden HNE erfolgreich als Modell zur Bestimmung der Toxizität von Dieselrußpartikeln verwendet. Kissel und Werner beispielsweise untersuchten Permeabilität und metabolische Stabilität verschiedener Peptide an HNE (Kissel und Werner, 1998). Ihr Modell wies eine vergleichbare metabolische Aktivität auf wie sie für nasale Mukosa beschrieben ist. Exzidierte bovine Mukosa wurde ebenfalls erfolgreich für Metabolisierungsuntersuchungen von Peptiden verwendet (Schmidt et al., 2000).

3. Materialien

3.1. Biologisches Material

Humanes nasales Gewebe wurde bei Turbinektomien entnommen, die im Städtischen Klinikum Braunschweig vorgenommen wurden. Die Patienten wurden vor der Operation schriftlich über die weitere Verwendung informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die zuständige Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover äußerte keine Bedenken hinsichtlich der Verwendung des humanen Gewebes für die geplanten Arbeiten. Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in isotone Kochsalzlösung bei 4 °C überführt. Innerhalb von 1 h erfolgte die Weiterverarbeitung.

Porcines Gewebe wurde von einem örtlichen Schlachtbetrieb zur Verfügung gestellt und direkt nach der Schlachtung gekühlt transportiert und für weitere Versuche verwendet.

3.2. Materialien für die Zellkultur

MEM Earle Medium, DMEM, Hams's F12, Fetales Kälberserum (FKS), L-Glutamin und nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) wurden von der Biochrom AG (Berlin) bezogen. 2 %ige EDTA Lösung wurde von MP (Heidelberg) erworben, PBS von ICN-LabSolutions (Northeim). Penicillin/Streptomycin-Lösung stammte von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich). Trypsin Lösung wurde von Gibco® Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen. Petrischalen, Transwell™ Zellkulturplatten mit Filtereinsätzen, Kulturflaschen und Kunststoff-Well-Platten wurden von Corning Life Sciences/Omnilab (Bremen) erworben. Pronase-Lösung, Natrium-Fluorescein, Propranolol-HCl, FITC-Dextran-4, Rhodamin 123, Verapamil-HCl, Retinolsäure, DMSO, Choleratoxin, Ethidiumbromid und Universal-Agarose stammten von Sigma (Seelze). Hämatoxylin wurde von Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Eosin von Merck (Darmstadt) bezogen.

Puffer hatten folgende Zusammensetzungen (in bidestilliertem Wasser):

Tabelle 1: Zusammensetzung von KRB (Krebs-Ringer-Puffer) pH 7,4.

Reagenz	Konzentration in wässriger Pufferlösung
NaCl	116,4 mM
KCl	5,4 mM
NaHCO ₃	25 mM
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	1 mM
HEPES	15 mM
D-Glucose-Monohydrat	5,6 mM
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,8 mM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	1,8 mM

Tabelle 2: Zusammensetzung von TE-Puffer pH 8.

Reagenz	Konzentration in wässriger Pufferlösung
TRIS	10 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 3: Zusammensetzung von TBE-Puffer pH 8.

Reagenz	Konzentration in wässriger Pufferlösung
TRIS	89 mM
Borsäure	89 mM
EDTA	2 mM

4. Methoden

4.1. Zellkulturen

4.1.1. Zellisolierung und Etablierung von Primärkulturen

4.1.1.1. Humane nasale Epithelzellen (HNE)

Das entnommene humane nasale Gewebe wurde mit PBS mit einem Zusatz von 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin gewaschen und in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten. Diese wurden mit der Epithelseite nach oben für 16-20 h in 0,1 %iger Pronase-Lösung in serumfreiem DMEM bei 4 °C inkubiert (Werner und Kissel, 1995). Nach der enzymatischen Dissoziation konnten die Zellen durch Pipettieren bzw. vorsichtiges Abschaben vom unterliegenden Gewebe getrennt und vereinzelt werden. Zur Inaktivierung der Pronase wurden die Zellen in serumhaltigem

(5 % FKS) Medium gewaschen, suspendiert und auf kollagenbeschichtete Oberflächen (siehe 4.1.4) aufgesät.

4.1.1.2. Humane nasale Fibroblasten (HNF)

Zur Gewinnung von humanen nasalen Fibroblasten wurde das nasale Bindegewebe durch Abschaben mit einem Skalpells vom Epithel befreit und in 3-4 mm² große Stücke zerteilt. Diese hefteten sich bei 37 °C innerhalb von 30 min auf einer Petrischale an und wurden dann mit Kulturmedium überschichtet. Nach 1-3 Wochen konnten die ausgewachsenen Fibroblasten mit Trypsin abgelöst und weiterkultiviert werden.

4.1.2. Zelllinie RPMI 2650

Die Zelllinie RPMI 2650 wurde 1962 aus einem Plattenepithelkarzinom der Nasenscheidewand gewonnen. Als Besonderheit wurde festgestellt, dass sie über eine längere Kultivierungsdauer mit 35 Passagen weiterhin ihren diploiden Charakter behält. Die Zellen sind relativ klein im Verhältnis zu anderen humanen Tumorzellen (Moore und Sandberg, 1964). In einer späteren Untersuchung wurde jedoch eine Veränderung der Chromosomen beobachtet, so dass von nun an von einem quasi-diploiden Zelltyp gesprochen wurde (Moorhead, 1965).

Die Zelllinie wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) in Braunschweig erworben und zur Etablierung eines eigenen Vorrats nach beschriebener Methode kultiviert (4.1.3).

4.1.3. Kultivierung und Subkultivierung

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 4 aufgelistet. Zur Subkultivierung wurden die Zellen kurz vor Erreichen der Konfluenz mit PBS bzw. EDTA-Lösung gewaschen und 5-8 min mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Der Prozess wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch Pipettieren vereinzelt, mittels Coulter Counter Z2 (Beckmann, Krefeld) gezählt und in einer Dichte von 800/cm² (HNF), mindestens 15.000/cm² (HNE) bzw. 40.000/cm² (RPMI 2650) in neue Kulturflaschen ausgesät.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Kultivierungsmedien für HNE, HNF und RPMI 2650.

Medium		Supplemente
HNE-Medium	DMEM:Ham´s F12 1:1	1 % L-Glutamin 1 µg/ml Insulin 1 µg/ml Transferrin 0,5 µg/ml Hydrocortison 10 ng/ml EGF 50 IU/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 ng/ml Choleratoxin 5 % FKS
HNF-Medium	DMEM	1 % L-Glutamin 50 IU/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 % FKS
RPMI 2650-Medium	MEM Earle	1 % L-Glutamin 1 % nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) 50 IU/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin 10 % FKS

4.1.4. Beschichtungen der Wachstumsoberflächen

Zur Beschichtung der Wachstumsoberflächen mit Kollagen wurde, wie in der Literatur beschrieben, extrahiertes Rattenschwanzkollagen (Reichl, 2003) in einer ethanolischen, essigsäuren Lösung (1,5 mg/ml) verwendet. Pro cm² wurden 90 µl dieser Lösung aufgetragen und über Nacht abdunsten gelassen.

Für eine zusätzliche Beschichtung mit Laminin bzw. Fibronectin wurden jeweils 270 µl/cm² einer Lösung (10 µg/ml) der Substanz in PBS ohne Magnesium und Calcium aufgegeben, 30 min bei 37 °C inkubiert und abgesaugt.

4.1.5. Mikroskopie

In der Routinekontrolle der Zellkulturen sowie zur genaueren Betrachtung der Zellmorphologie und zur Dokumentation wurde ein Umkehrmikroskop Olympus IX 50 mit Phasenkontrast und digitaler Bildaufnahme verwendet. Die Bearbeitung und Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit Hilfe von Analysis- bzw. CellF-Software (Olympus, Hamburg).

4.1.6. Wachstumsverhalten und Vitalität

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Zellen zu charakterisieren und optimale Bedingungen zu ermitteln, wurden Wachstumskurven aufgenommen.

Hierzu wurden je nach Zellart bestimmte Zellzahlen (HNF und RPMI 2650: 10.000/Well, HNE: 50.000/Well) in 24-Well-Kulturplatten ausgesät. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen aus drei Wells wie unter 4.1.3 beschrieben abgelöst, vereinzelt und gezählt.

4.1.6.1. HNE

Das Wachstum bzw. die Vitalität humaner nasaler Epithelzellen in Primärkultur wurde unter folgenden Kultivierungsbedingungen untersucht:

1:1-Mischung aus DMEM und Ham's F12, supplementiert mit 1 % L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin, sowie 10 ng/ml Cholera toxin und 5 % FKS (Grundmedium). Zusätze von 1 µg/ml Insulin, 1 µg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Hydrocortison sowie 10 ng/ml EGF wurden einzeln und in Kombination verwendet (siehe Tabelle 5). Nach 4-5 Tagen Kultur wurde die Zellvitalität mittels MTT-Test bestimmt (Mosmann, 1983).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Medien für Wachstumsuntersuchungen mit HNE.

Medium	Supplemente
1. Grundmedium (GM)	
2. GM + Insulin	1 µg/ml Insulin
3. GM + Transferrin	1 µg/ml Transferrin
4. GM + HC	0,5 µg/ml Hydrocortison
5. GM + EGF	10 ng/ml EGF
6. GM + NEAA	1 % Non-essential Amino Acids
7. HNE-Medium	1 µg/ml Insulin 1 µg/ml Transferrin 0,5 µg/ml Hydrocortison 10 ng/ml EGF

In gleicher Weise wurde die Vitalität in Abhängigkeit von der Beschichtung der Wachstumsoberfläche bestimmt. Hierfür wurden Kollagenbeschichtung, Kollagen + Fibronectin-, Kollagen + Laminin- und Kollagen + Fibronectin + Laminin-Beschichtungen untersucht.

Das Wachstum wurde in HNE-Medium mit und ohne FKS, mit und ohne Kollagenbeschichtung, mit und ohne Retinolsäure (10 ng/ml) sowie in HNF-Kulturmedium mit und ohne Kollagenbeschichtung mittels Wachstumskurven verfolgt. Hierfür wurden aufgrund geringer Zellzahlen jeweils verschiedene Isolierungscharen verwendet.

4.1.6.2. HNF

Das Wachstum humaner nasaler Fibroblasten in Primärkultur und in verschiedenen Passagen wurde in folgenden Kultivierungsbedingungen untersucht: HNE-Kulturmedium ohne Retinolsäure mit und ohne Choleratoxin, RPMI 2650-Kulturmedium mit 5 bzw. 10 % FKS sowie in HNF-Kulturmedium mit 10 % FKS (siehe Tabelle 4). Des Weiteren wurde von verschiedenen Isolierungschargen die passageabhängige Zellzahlentwicklung sowie das Wachstumsverhalten in verschiedenen Passagen ermittelt, um die Verwendbarkeit der Fibroblasten beurteilen zu können.

4.1.6.3. RPMI 2650

Das Wachstum der RPMI 2650-Epithelzellen wurde in folgenden Kultivierungsbedingungen untersucht: RPMI 2650-Kulturmedium ohne Beschichtung, mit Kollagenbeschichtung, mit Kollagen-Laminin Beschichtung, mit Kollagen-Fibronectin-Beschichtung bzw. mit Kollagen-Laminin-Fibronectin-Beschichtung, in HNE-Kulturmedium mit und ohne FKS, mit und ohne Choleratoxin sowie mit und ohne Retinolsäure.

4.1.7. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter 4.1.3 beschrieben abgelöst, vereinzelt und gezählt. In einer Konzentration von $1-1,5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO) wurden die Zellen suspendiert und in Kryoröhrchen eingefroren. Hierfür wurden sie zunächst ca. 2 h in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert und dann in die flüssige Phase (-196 °C) abgesenkt. Zum Auftauen wurden die Röhrchen mit der Zellsuspension zügig in warmem Wasser aufgetaut, die Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt und vorsichtig mit vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Medium gewechselt, um restliches DMSO zu entfernen.

4.2. Permeationsmodelle

4.2.1. Exzidiertes Gewebe

4.2.1.1. Präparation

Humane nasale Mukosa wurde wie unter 3.1 beschrieben gewonnen. Das Gewebe wurde sofort nach der Entnahme in isotone Kochsalzlösung bei 4 °C überführt.

Innerhalb von 1 h erfolgte die Weiterverarbeitung. Dazu wurde das Gewebe zunächst mehrfach in KRB gewaschen und anschließend präpariert. Knorpel und Knochen wurden entfernt und die Schleimhaut je nach Größe des Gewebestückes weiter zerteilt.

4.2.1.2. Mikroskopie

Kleinere Gewebestücke wurden über Nacht in Formalin fixiert, über eine Ethanol-Reihe entwässert und in Technovit 3040 (Heraeus Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Mit einem Mikrotom (Microm HM355S, Microm International, Walldorf) angefertigte Schnitte von ca. 3-4 μm Dicke wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und mikroskopisch untersucht.

4.2.1.3. TEER-Messungen

Die TEER-Werte der Gewebestücke wurden direkt vor der Permeation ermittelt. Dafür wurde das Gewebe in am Institut aus Acrylglas angefertigte Ussing-Kammern eingespannt. Je nach Größe des Gewebestückes wurden dabei Kammern mit einer Permeationsfläche von 0,196 cm^2 bzw. 0,0707 cm^2 verwendet. Zur Fixierung dienten integrierte Nadeln. Die Abdichtung der Kammern erfolgte durch O-Ringe sowie Silikonpaste. Nach dem Zusammensetzen und Fixieren der Hälften wurden auf beiden Seiten 2 ml vorgewärmter KRB luftblasenfrei eingefüllt, 1 h bei 37 °C äquilibriert und dann mittels EVOM und STX3-Elektroden (WPI, Berlin) vermessen. Die Messwerte wurden bezogen auf die Permeationsfläche angegeben.

4.2.1.4. Permeationsuntersuchungen

Die Permeationen wurden wie folgt durchgeführt: Die Testsubstanzen wurden in KRB in den angegebenen Konzentrationen gelöst (Fluorescein-Natrium: 25 $\mu\text{g/ml}$, Propranolol-HCl: 1 mg/ml und FITC-Dextran 4000: 500 $\mu\text{g/ml}$) und die Donorlösung auf 37 °C temperiert. Das Gewebe wurde in im Wärmeschränk temperierte Ussing-Kammern eingespannt (siehe 4.2.1.3). Nach 1 h Äquilibration wurde die TEER-Messung durchgeführt, der KRB entfernt und basolateral durch frischen Akzeptor (KRB), apikal durch Donor ersetzt und die Zeitmessung gestartet. Auch hier betrug das Volumen auf beiden Seiten 2 ml. Zu festgesetzten Zeitpunkten (10, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 min) wurden Proben von 200 μl (Propranolol-HCl: 600 μl) aus dem Akzeptor entnommen und durch temperierten KRB ersetzt. Vor der

Probennahme wurde der Akzeptor durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Die Probennahme erfolgte direkt vor dem permeierten Gewebe.

4.2.2. Epitheliale Modelle der nasalen Mukosa

4.2.2.1. Aufbau und Kultivierung der Modelle

Epitheliale Modelle der nasalen Mukosa wurden aus RPMI 2650 Zellen auf Transwell Filtereinsätzen für 12-Well-Kulturplatten (Polycarbonat, 3 µm Porengröße) aufgebaut. Dieser Einsatz ermöglicht sowohl eine submerse Kultivierung als auch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze. Nach einer eventuellen Vorbehandlung (Beschichtung) der Filtereinsätze (s. 4.1.4) und Einsetzen der Filter in die 12-Well-Kulturplatten wurden jeweils 0,5 ml einer Zellsuspension in Kulturmedium auf den Filter aufgebracht. Die Konzentration der Suspension war dabei abhängig von der angestrebten Zellzahl im Modell (Standardmodell: 400.000 Zellen/ml). Die Filter wurden mit 1,5 ml Kulturmedium unterschichtet. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich.

Das nasale Epithel ist in vivo nicht von einer Flüssigkeitsschicht wie in submerser Kultur bedeckt, da die Mukusschicht nur etwa eine Dicke von 5 µm hat (Ugwoke et al., 2001). Daher erscheint es sinnvoll, die Modelle auch an der Luft-Medium-Grenze zu kultivieren (Air-Liquid-Interface, ALI). Diese Methode wurde bereits als eine Möglichkeit beschrieben, die Differenzierung humaner nasaler Epithelzellen in Primär- und Sekundärkultur besser zu induzieren als durch submerse Kultur (Lee et al., 2005; Lin et al., 2007b; Yeh et al., 2007).

Zur Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze wurden die Einsätze mit Hilfe von Metallplatten bzw. Kunststoffringen angehoben, so dass eine Versorgung nur von unten mit jeweils 2 ml Kulturmedium möglich war. Der Zeitpunkt dieses Anhebens wurde variiert (Standardmodell: 1 Woche nach Aussaat). Ebenfalls variabel wurde die gesamte Kultivierungsdauer gestaltet (Standardmodell: 3 Wochen nach Aussaat). Nach der angestrebten Kultivierungsdauer konnten die Modelle für mikroskopische Untersuchungen oder Permeationsstudien verwendet werden.

4.2.2.2. HNF-Kokulturen

Neben den epithelialen Modellen, die nur aus Epithelzellen aufgebaut wurden, sollte insbesondere der Einfluss von humanen nasalen Fibroblasten auf die Eigenschaften der Modelle untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine kontaktlose HNF-

Kokultur verwendet. Hierfür wurden zunächst jeweils 20.000 HNF auf den Boden von 12-Well-Kulturplatten ausgesät und zwei Tage in HNF-Kulturmedium kultiviert. Nach zwei Tagen wurde das Medium entfernt, Transwell Filtereinsätze in die Platten eingesetzt und auf diese RPMI 2650-Epithelzellen aufgesät. Diese Modelle wurden im Weiteren behandelt wie in 4.2.2.1 beschrieben.

4.2.2.3. Mikroskopie

Das Wachstum der Zellen auf den Transwell Filtereinsätzen konnte während der Kultivierungsdauer mikroskopisch beobachtet werden.

Die Modelle wurden nach der angegebenen Kultivierungsdauer wie in 4.2.1.2 beschrieben behandelt und mikroskopisch im Hinblick auf Dichtigkeit und Dicke der Epithelzellschicht untersucht.

4.2.2.4. TEER-Messungen

Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) der epithelialen Modelle wurde mit Hilfe eines EVOM mit zusätzlicher Endohm-Messkammer (WPI, Berlin) direkt in den Transwell-Filtereinsätzen ermittelt. Die Transwell-Filtereinsätze wurden auf Raumtemperatur gebracht und anschließend in der Messkammer, die das entsprechende Kulturmedium enthielt, vermessen. Parallel wurde in jeder Kulturplatte ein leerer Filtereinsatz mitkultiviert und vermessen. Die Messwerte wurden um den Wert dieses leeren Filters korrigiert und bezogen auf die Wachstumsoberfläche angegeben.

TEER-Werte wurden in Abhängigkeit von verschiedenen Kulturbedingungen ermittelt. Neben dem Zeitpunkt des Hochsetzens an die Luft-Medium-Grenze wurden verschiedene Zellzahlen ausgesät, unbeschichtete und kollagenbeschichtete Filter sowie verschiedene Medienzusammensetzungen untersucht. Letztere sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Medienzusammensetzungen für TEER-Untersuchungen an epithelialen Modellen (NEAA: Nichtessentielle Aminosäuren, FKS: Fetales Kälberserum, CT: Cholera toxin, RA: Retinolsäure).

Grundmedium	Zusätze
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>10 % FKS</u>	A Keine
	B + CT 10 ng/ml
	C + RA 10 ng/ml
	D + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>2 % FKS</u>	E Keine
	F + CT 10 ng/ml
	G + RA 10 ng/ml
	H + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>10 % FKS</u>	I + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml
	J + CT 10 ng/ml + DMSO 5 %
	K + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
	L + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>2 % FKS</u>	M + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml
	N + CT 10 ng/ml + DMSO 5 %
	O + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
	P + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %

4.2.2.5. Permeationsuntersuchungen

Die epithelialen Modelle wurden im Hinblick auf die passive Permeation untersucht. Hierfür wurden Markersubstanzen für die parazelluläre und die transzelluläre Permeation verwendet. Daneben wurde auch ein Marker mit hohem Molekulargewicht eingesetzt.

Als Modellstoff für die parazelluläre Permeation wurde Fluorescein-Natrium (Donorkonzentration 25 µg/ml) gewählt, für die transzelluläre Permeation Propranolol-HCl (Donorkonzentration 1 mg/ml) und als Modellstoff mit hohem Molekulargewicht FITC-Dextran 4000 (Donorkonzentration 500 µg/ml).

Die Testsubstanzen wurden in KRB in den angegebenen Konzentrationen gelöst und die Donorlösung auf 37 °C temperiert. Die epithelialen Modelle wurden kultiviert wie unter 4.2.2.1 beschrieben. Vor der Permeation wurden sie einmal mit auf 37 °C temperiertem Krebs-Ringer-Puffer (KRB) gewaschen und dann 1 h in KRB bei 37 °C

äquiliibriert. Wurde eine TEER-Messung zur Kontrolle vor der Permeation durchgeführt, so erfolgte sie zu diesem Zeitpunkt. Nach dem Entfernen des Äquilibrationsmediums wurden die Transwell-Filtereinsätze in eine neue, mit jeweils 1,5 ml temperiertem Akzeptormedium (KRB) pro Well befüllte 12-Well-Kulturplatte überführt. 0,5 ml der Donorlösung wurden auf die apikale Seite aufgebracht und die Zeitmessung gestartet. Zu festgesetzten Zeitpunkten wurden Proben von 100 µl (im Fall von Propranolol-HCl: 500 µl) aus dem Akzeptor entnommen und durch temperierten KRB ersetzt. Während der gesamten Permeationsdauer wurden die Platten durch einen Schüttler kreisförmig horizontal mit 200 U/min bewegt und bei 37 °C gehalten.

Im Hinblick auf die Funktionalität von Transportproteinen in den Modellen wurde als Markersubstanz für den ABCB1-Transporter Rhodamin 123 untersucht. Die Donorkonzentration betrug standardmäßig 25 µg/ml in KRB. Die Permeation wurde sowohl in der Richtung apikal nach basolateral als auch basolateral nach apikal durchgeführt. Für eine Permeation von basolateral nach apikal wurden die Filtereinsätze in eine neue, mit jeweils 1,5 ml Donorlösung befüllte 12-Well-Kulturplatte überführt und 0,5 ml des Akzeptors wurden auf die apikale Seite aufgebracht. Zusätzlich wurden Versuche mit dem ABCB1-Inhibitor Verapamil durchgeführt. Dafür wurde eine Verapamil-HCl-Lösung (20 µg/ml) in KRB vorbereitet und auf 37 °C temperiert. Während der Äquilibration wurde nach 30 min der KRB entfernt und durch diese Lösung ersetzt, die weitere 30 min einwirken konnte.

4.2.3. Dreidimensionale Modelle der nasalen Mukosa (Konstrukte)

4.2.3.1. Aufbau und Kultivierung der Modelle

Der Aufbau der dreidimensionalen Modelle der nasalen Mukosa erfolgte schrittweise in Transwell-Filtereinsätzen (Polycarbonat, Porengröße 3 µm) für 6-Well-Kulturplatten. Das aus Rattenschwänzen erhaltene Kollagen wurde in einer Konzentration von 4,8 mg/ml in 0,05 %iger Essigsäure gelöst. Zur Herstellung von 6 Konstrukten wurden 8 ml dieser Lösung mit 11 ml 0,05 %iger Essigsäure verdünnt. Diese Kollagenlösung wurde mit 5,6 ml einer Gelvormischung versetzt. Die Gelvormischung setzte sich aus 2,2 ml 10 x MEM, 0,2 ml L-Glutamin, 0,7 ml Natriumhydrogencarbonatlösung (71,2 mg/ml) und 2,5 ml FKS zusammen. Anschließend wurden zügig 2 ml einer Fibroblastensuspension in der Mischung verteilt, diese gründlich gemischt und in Anteilen von 4 ml je Well auf die

Filtereinsätze aufgebracht. HNF wurden in den Passagen 2 und 3 verwendet. Die Konzentration der Fibroblastensuspension war abhängig von der angestrebten Fibroblastenzahl im Kollagengel (25.000, 50.000 bzw. 100.000 Zellen je Konstrukt). Die verfestigten Gele wurden an Tag 1 nach dem Ausgießen mit einem Spatel von der Wandung und dem Boden des Filtereinsatzes abgelöst und bis zum Tag 7 in HNF-Kulturmedium submers kultiviert. Anzahl und Viabilität der Fibroblasten waren an der Kontraktion der Kollagengele deutlich zu erkennen, die ab Tag 2 zu beobachten war.

Zur Rekonstruktion des Epithels wurden an Tag 7 RPMI 2650-Zellen aufgesät. Hierfür wurden Zellen in den Passagen 5-13 wie unter 4.1.3 beschrieben abgelöst, vereinzelt und gezählt. Die angestrebte Anzahl Zellen (100.000, 200.000 bzw. 400.000 Zellen je Konstrukt) wurde in 50 bis 70 µl RPMI 2650-Kulturmedium suspendiert und vorsichtig auf die von Medium befreiten Kollagengele aufgetragen. Zur Anheftung der Zellen wurden die Konstrukte für ca. 2 h bei 37 °C im Inkubator belassen, bevor zur submersen Kultivierung jeweils 5 ml RPMI 2650-Kulturmedium zugesetzt wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Zur Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze wurden die Einsätze an Tag 14 mit Hilfe von Metallplatten bzw. Kunststoffringen angehoben, so dass eine Versorgung nur von unten mit jeweils ca. 3,5 ml Kulturmedium möglich war. Hierbei stand das Epithel in Kontakt zur Luftumgebung und wurde nur durch Diffusion der Nährstoffe durch das Kollagengel versorgt. Nach weiteren 7 bis 14 Tagen konnten die Modelle für mikroskopische Untersuchungen, TEER-Messungen oder Permeationsstudien verwendet werden.

4.2.3.2. Kontraktion der Kollagengele

Neben dem Wachstumsverhalten ist die Kontraktion der Kollagengele mit inkorporierten HNF ein weiteres Maß für die Vitalität der Fibroblasten (Bell et al., 1979). Sie gibt zudem einen Anhaltspunkt, ob in verschiedenen Chargen und Passagen gleichbleibende Eigenschaften vorhanden sind. Vorteilhaft ist, dass die Messung nichtinvasiv während der Kultivierung der dreidimensionalen Modelle erfolgen kann, so dass die Modelle über den gesamten Zeitraum der Kultivierung vor der Permeation oder histologischen Untersuchung beobachtet werden können.

Nach dem Ablösen der Kollagengele von Wandung und Filter an Tag 1 nach der Aussaat wurde der Durchmesser der Gele dreimal wöchentlich mit einem Lineal bestimmt.

4.2.3.3. Mikroskopie

Die Modelle wurden nach der angegebenen Kultivierungsdauer wie in 4.2.1.2 beschrieben behandelt und mikroskopisch im Hinblick auf Dichtigkeit und Dicke der Epithelzellschicht sowie Dicke des Kollagengels und Verteilung der Fibroblasten untersucht.

4.2.3.4. TEER-Messungen

Die TEER-Werte der dreidimensionalen Modelle wurden direkt vor der Permeation in Ussing-Kammern ermittelt wie unter 4.2.1.3 beschrieben.

4.2.3.5. Permeationsuntersuchungen

Die dreidimensionalen Modelle wurden mit den gleichen Markersubstanzen permeiert wie die epithelialen Modelle. Die Permeationen wurden in Ussing-Kammern wie unter 4.2.1.4 beschrieben durchgeführt.

Rhodamin 123 wurde ebenso wie bei den epithelialen Modellen sowohl in der Richtung apikal nach basolateral als auch basolateral nach apikal permeiert. Auch hier kam zusätzlich Verapamil-HCl als Inhibitor des ABCB1-Transporters zum Einsatz.

4.2.4. Quantitative Bestimmung der Markersubstanzen

4.2.4.1. Natrium-Fluorescein, FITC-Dextran 4000 und Rhodamin 123

Die Proben wurden direkt in schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten überführt, die im Tecan Genios Fluoreszenz-Multiplattenreader mit Magellan Software (Tecan, Crailsheim) vermessen wurden (Natrium-Fluorescein und FITC-Dextran: Anregungswellenlänge 485 nm, Emissionswellenlänge 535 nm; Rhodamin 123: Anregungswellenlänge 500 nm, Emissionswellenlänge 535 nm). Neben den Proben wurden in jeder Platte Blindwerte sowie eine Verdünnungsreihe vermessen (Natrium-Fluorescein: 0,01 µg/ml bis 16 µg/ml; FITC-Dextran: 0,5 µg/ml bis 100 µg/ml; Rhodamin 123: 0,01 µg/ml bis 16 µg/ml). Anhand dieser Kalibriergeraden ($r^2 \geq 0,99$) wurden die Konzentrationen der einzelnen Proben bestimmt.

4.2.4.2. Propranolol-HCl

Die Proben wurden mittels HPLC vermessen. Hierfür wurde ein System der Firma Waters (Eschborn) verwendet, bestehend aus dem Autosampler 717 plus, der Pumpe 515, dem Controller 600 und dem UV-Detektor 486. Das Fließmittel setzte

sich folgendermaßen zusammen: Methanol 114 Teile, Phosphat-Pufferlösung pH6 (R1 nach Ph. Eur. 6) 45 Teile, Triethylamin 0,2 Teile. Die Proben wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine RP-Säule (LiChrospher 100, RP 18, 125-4 mm, Merck, Darmstadt) geleitet und bei 227 nm vermessen. Die Auswertung erfolgte mittels Clarity-Software.

4.3. Intraindividuelle Schwankungen der Permeationseigenschaften am Beispiel von porcinem Gewebe

4.3.1. Präparation von porcinem Gewebe

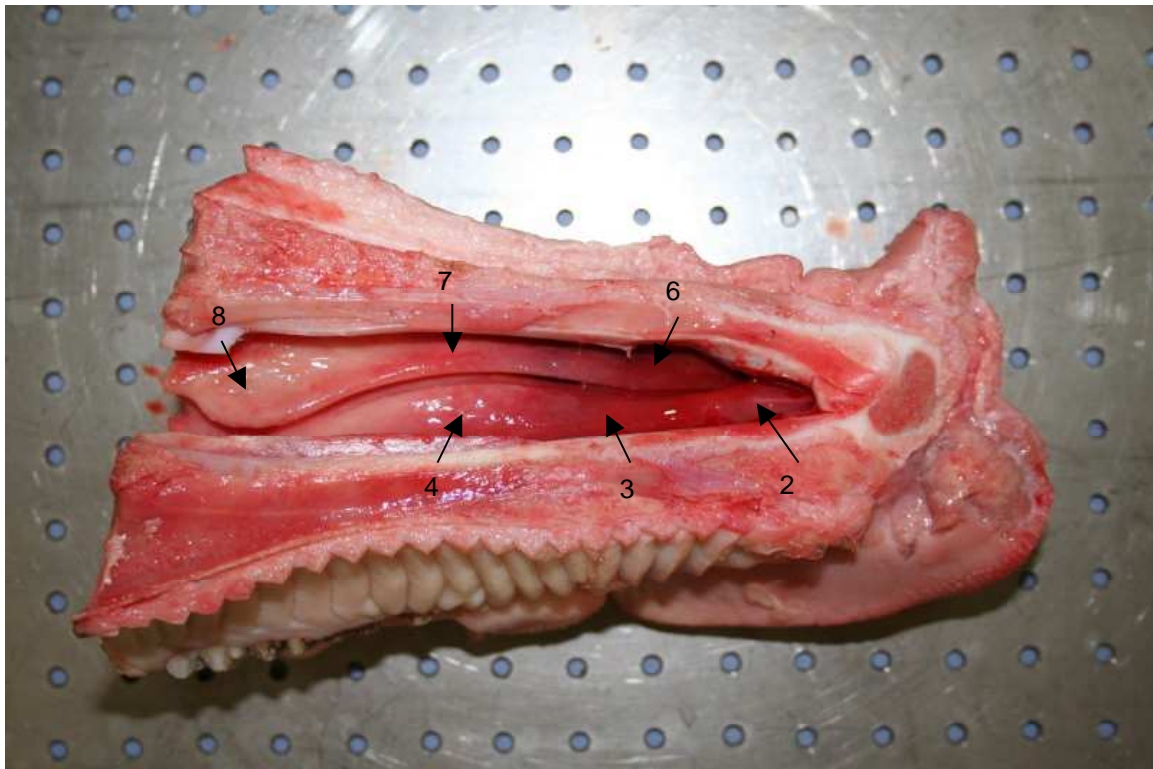


Abbildung 4.1 Halbierte Schweinenase ohne Nasenscheidewand, vor der Präparation. Zu erkennen sind die untere und die obere Nasenmuschel. Entnahmepunkte sind, soweit zugänglich, mit Pfeilen markiert.

Tabelle 7: Entnahmepunkte aus der Schweinenase.

- | | |
|----|---|
| 1 | hinten den Muscheln vorn (äußere Nasenwand) |
| 2 | untere Muschel vorn |
| 3 | untere Muschel Mitte |
| 4 | untere Muschel hinten |
| 5 | hinten den Muscheln hinten (äußere Nasenwand) |
| 6 | obere Muschel vorn |
| 7 | obere Muschel Mitte |
| 8 | obere Muschel hinten |
| 9 | Nasenscheidewand vorn |
| 10 | Nasenscheidewand hinten |

Porcines Gewebe wurde von Schlachttieren gewonnen. Nach der Schlachtung wurde die entlang der Nasenscheidewand halbierte Nase (Abbildung 4.1) (zumeist inklusive Nasenscheidewand) auf Eis gekühlt und schnellstmöglich weiterverarbeitet. Dazu wurde zunächst die Nasenscheidewand entfernt, so dass die Nasenhöhle offen lag. Dann wurde an den beschriebenen Stellen jeweils ca. 1 cm² Schleimhaut vom unterliegenden Knochen bzw. Knorpel abpräpariert und mehrfach in KRB gewaschen.

4.3.2. Entnahmeorte

Die Entnahmeorte sind in Tabelle 7 aufgelistet und, soweit erkennbar, in Abbildung 4.1 mit Pfeilen markiert.

4.3.3. TEER-Messungen

Die TEER-Werte der Gewebestücke wurden direkt vor der Permeation wie unter 4.2.1.3 beschrieben ermittelt.

4.3.4. Permeationsuntersuchungen

Das exzidierte Gewebe wurde mit dem Modellstoff Natrium-Fluorescein permeiert wie unter 4.2.1.4 beschrieben.

4.4. PCR-Untersuchungen zur mRNA-Expression ausgewählter ABC-Transporter

4.4.1. RNA-Isolierung

4.4.1.1. Zellkulturen

Die RNA-Isolierung erfolgte mittels TRIzol-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe), das in Vorversuchen eine gute Handhabbarkeit und gute Ausbeuten gezeigt hatte.

Die Zellen wurden wie unter 4.1.3 beschrieben kultiviert, trypsinisiert und gezählt. Jeweils 5 Millionen Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt, 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Redispergieren inkubiert und als Suspension in ein RNase-freies Eppendorf-Tube überführt. Nach Zusatz von 0,2 ml Chloroform, 15 s Schütteln und 2-3 min Inkubation bei Raumtemperatur trennten sich durch Zentrifugation (2-8 °C, 15 min, 12.000 g) zwei Phasen voneinander. Die wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues Tube überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol ausgefällt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation (2-8 °C, 10 min, 12.000 g) war auf dem Boden ein Pellet zu erkennen. Dieses wurde in 1 ml 75 % (V/V) Ethanol redispergiert und wieder abzentrifugiert (2-8 °C, 5 min, 7500 g). Der Überstand wurde entfernt, das Pellet kurz an der Luft trocknen gelassen und dann in RNase-freiem Wasser bei 55-60 °C für 10 min gelöst. Die RNA-Lösung konnte bei -80 °C aufbewahrt werden.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Lösung 1:50, 1:100 sowie 1:200 in TE-Puffer verdünnt und die Absorption jeder Lösung einmal bei 260 nm und einmal bei 280 nm gegen TE-Puffer mittels Spekol 1300-Photometer vermessen (Analytik Jena, Jena). Die Konzentration der Lösungen wurde nach der folgenden Gleichung ermittelt:

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

OD₂₆₀: Absorption bei 260 nm

V: Verdünnungsfaktor

F: Multiplikationsfaktor (bei RNA: 40)

Für die weitere Berechnung wurde der Mittelwert der aus den drei Verdünnungen ermittelten Konzentrationen verwendet.

Das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ wird als Maß für die Reinheit der Lösung herangezogen. Möglicherweise mitisolierte Proteine haben eine hohe Absorption bei 280 nm. Der Quotient von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ sollte bei einer RNA-Isolierung optimalerweise bei 2 liegen.

4.4.1.2. Epitheliale Modelle

Zur RNA-Isolierung aus epithelialen Modellen wurden zunächst die Zellen von den Transwell-Filtereinsätzen abgelöst. Dafür wurde das Medium entfernt, jedes Transwell mit 0,5 ml EDTA-Lösung gespült und wieder abgesaugt. Nach Zugabe von 200 µl Trypsin je Well wurde mindestens 5 min bei 37 °C inkubiert und 500 µl PBS hinzugegeben. Durch kräftiges Pipettieren konnten die Zellen nun vom Filter abgelöst und vereinzelt werden. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, noch einmal durchpipettiert, mit serumhaltigem Medium verdünnt und gezählt. Jeweils 5 Millionen Zellen wurden dann wie unter 4.4.1.1 beschrieben weiterverarbeitet.

4.4.1.3. Dreidimensionale Modelle

Zur Gewinnung von RNA aus dreidimensionalen Modellen musste zunächst das Konstrukt aufgeschlossen werden. Hierfür wurde jeweils ein Konstrukt in ein Eppendorf-Tube überführt und mit 1 ml TRIzol Reagenz versetzt. Nach Zugabe von Entschäumer und ca. 0,5 bis 1 ml Glasperlen wurden die Tubes in die Mühle Retsch MM301 (Retsch, Hahn) eingespannt und 10 min bei 30 Hz bewegt. Glasperlen und größere Fragmente wurden abzentrifugiert und der Überstand wie unter 4.4.1.1 beschrieben weiterverarbeitet.

4.4.2. Reverse Transkription

Für die cDNA-Synthese mittels reverser Transkription wurden jeweils 5 µg RNA eingesetzt. Es wurde mit RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot) gearbeitet. Das entsprechende Volumen der RNA-Lösung wurde in einem RNase-freien 0,2 ml-Tube mit 1 µl Random hexamer Primer (0,2 µg/µl, bzw. 100 pmol/µl, Fermentas) versetzt und mit RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) auf 12,5 µl aufgefüllt. Die in Tabelle 8 aufgeführten Reagenzien wurden als „Mastermix“ vorbereitet, von dem dann in jedes Gefäß 7,5 µl pipettiert wurden.

Tabelle 8: Je Probe eingesetzte Menge der Reagenzien für den Mastermix der Reversen Transkription (Reagenzien von Fermentas).

Reagenz	Volumen
5x Reaktionspuffer für RevertAid	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor (40 u/µl)	0,5 µl
dNTP Mix (10 mM each)	2 µl
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 u/µl)	1 µl

Um die Flüssigkeitströpfchen zu vereinigen und auf den Boden der Tubes zu bringen, wurden die Tubes kurz abzentrifugiert und dann im Thermocycler Labcycler Gradient (Sensoquest, Göttingen) prozessiert. Die Temperaturabfolge war: 10 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C, 10 min bei 70 °C und anschließend Herunterkühlen auf 4 °C. Die Lagerung der Proben erfolgte bei –80 °C.

4.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Als Template für die PCR wurden jeweils 2 µl der mit Reverser Transkription erhaltenen cDNA-Lösung verwendet. Die in Tabelle 9 aufgeführten Reagenzien wurden als „Mastermix“ vorbereitet, von dem dann in jedes Gefäß 23 µl pipettiert wurden.

Tabelle 9: Je Probe eingesetzte Menge der Reagenzien für den Mastermix der PCR (Reagenzien von Fermentas).

Reagenz	Volumen
10x DreamTaq Buffer	2,5 µl
dNTP Mix 10 mM each	0,5 µl
DreamTaq DNA polymerase 5 u/ml	0,125 µl
Forward Primer 20 µM	0,625 µl
Reverse Primer 20 µM	0,625 µl
DEPC-behandeltes Wasser	18,625 µl

Die benötigte cDNA wurde aufgetaut, und in beschriftete 0,2 ml Tubes jeweils 23 µl Mastermix pipettiert, danach wurden 2 µl der cDNA dazugegeben. Um die Flüssigkeitströpfchen zu vereinigen und auf den Boden der Tubes zu bringen, wurden die Tubes kurz mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert und dann im Thermocycler prozessiert (siehe Tabelle 10). Schritt 2-4 wurden in 30 Zyklen wiederholt.

Bei jeder Durchführung wurde neben den zu untersuchenden Proben eine Positivprobe sowie eine Negativprobe (2 µl DEPC-behandeltes Wasser statt

Template) mitlaufen gelassen. Als Positivprobe diente für alle Transporter außer CFTR cDNA aus CaCo-2-Zellen, einer Zelllinie aus einem humanen Kolonkarzinom, für die Untersuchungen zu CFTR cDNA aus CaLu-3-Zellen, einer humanen Lungenkarzinomzelllinie. CaCo-2-Zellen exprimieren den MDR1-Transporter sowie die untersuchten MRP-Transporter, CaLu-3-Zellen u. a. den CFTR-Transporter (Hamilton et al., 2001). Bis zur Gelelektrophorese wurden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Tabelle 10: Temperaturschritte für die PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur
1	5 min	94 $^{\circ}\text{C}$
2	30 s	94 $^{\circ}\text{C}$
3	30 s	Individuell optimierte Annealing-Temperatur
4	1 min	72 $^{\circ}\text{C}$
5	5 min	72 $^{\circ}\text{C}$
6	Bis zur Entnahme	4 $^{\circ}\text{C}$

4.4.3.1. Primer-Design

Die benötigten Gensequenzen wurden über die entsprechenden Funktionen des National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Mit dieser Sequenz konnten nun über das Programm Primer3 (Rozen und Skaletsky, 1998) passende Primer gefunden werden. Hierbei ist es möglich, die Länge und Zusammensetzung der Primer und auch die Länge des Produkts sowie zahlreiche weitere Parameter festzulegen. Anschließend wurden die vorgeschlagenen Primer hinsichtlich ihrer Spezifität mit Hilfe des Programmes „Blast“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) getestet und jeweils einer ausgewählt, der keine weiteren Bindungsstellen im Humangenom besitzt. Die Primer (siehe Tabelle 11) wurden von der Firma Invitrogen individuell hergestellt.

4.4.3.2. Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Für MDR1 wurden zwei Arten der Reversen Transkriptase untersucht, RevertAid und RevertAid H Minus (beide von Fermentas). Letztere enthält einen zusätzlichen Schutz vor RNase. In der Stärke und Schärfe der Banden der Produkte aus der folgenden PCR war jedoch kein Unterschied festzustellen, daher wurde bei allen weiteren Versuchen RevertAid verwendet.

Die Templatmenge für die folgende PCR betrug jeweils 2 µl, die Zykluszahl 30. Die optimale Annealingtemperatur wurde jeweils individuell bestimmt, indem eine Probe-PCR mit CaCo-cDNA (bzw. CaLu-cDNA bei CFTR) als Positivkontrolle mit einem Temperaturgradienten durchlaufen wurde. Die untersuchten Temperaturen bewegten sich im Bereich von $T_m - 5\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ (T_m = Schmelztemperatur des Primerpaars). Über die Stärke und Schärfe der Banden wurde dann die optimale Annealing-Temperatur gewählt. Die in Tabelle 12 aufgeführten Temperaturen erwiesen sich für die einzelnen Primer als am besten geeignet.

Tabelle 11: Basenfolgen der Primer für die PCR.

Ziel-DNA	Forward	Reverse	Produkt-Länge
ABCB1 (MDR1)	GCTCCTGACTATGCCAAAGCC	CTTCACCTCCAGGCTCAGTCCC	201 bp
ABCC1 (MRP1)	AGGTGGACCTGTTTCGTGAC	ACCCTGTGATCCACCAGAAGG	183 bp
ABCC2 (MRP2)	TGCTTCCTGGGGATAATCAGC	CACGGATAACTGGCAAACCTG	211 bp
ABCC3 (MRP3)	GGCGTCTATGCTGCTTTAGG	CCTTGGAGAAGCAGTTCAGG	187 bp
ABCC4 (MRP4)	CGATTGAAGATCTTCCTGG	GGTGTTCAATCTGTGTGC	239 bp
ABCC5 (MRP5)	CTTCCCGTGGTTCCTTGTGG	GTCAGGGGAGGGAGCCTTGT	529 bp
ABCC7 (CFTR)	TGTGCATAGAGAGCCTGTGG	TAGGAGATTGTGGGGAGTGC	198 bp

Tabelle 12: Optimale Annealing-Temperaturen für die verwendeten Primer.

Ziel-cDNA	Annealing-Temperatur
ABCB1 (MDR1)	63,1 °C
ABCC1 (MRP1)	59,1 °C
ABCC2 (MRP2)	59,1 °C
ABCC3 (MRP3)	63,1 °C
ABCC4 (MRP4)	53 °C
ABCC5 (MRP5)	63,3 °C
ABCC7 (CFTR)	57,5 °C

4.4.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

2 % Agarose wurden in TBE-Puffer gelöst, unter Rühren vorsichtig aufgekocht und etwas abkühlen gelassen. Dann wurden 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) hinzugegeben und durch leichtes Schütteln gleichmäßig verteilt. Die fertige Lösung

wurde in einen Gelhalter ausgegossen, wobei ein Kamm mit 20 Taschen verwendet wurde. Das erstarrte Gel wurde anschließend mit dem Gelhalter in die horizontale Elektrophoresekammer eingesetzt, der Kamm entfernt und das Gel mit TBE-Puffer bedeckt.

Jeweils 10 µl der Proben wurden mit 2 µl Ladepuffer (6x MassRuler Loading Dye Solution, Fermentas) versetzt und kurz abzentrifugiert. Jeweils 10 µl der Mischung wurden in die Taschen des Gels eingefüllt.

Neben den Proben wurden DNA-Leitern aufgetragen (FastRuler DNA Ladder, Low Range, sowie O'GeneRuler DNA Ladder, Low Range, beide Fermentas). FastRuler entwickelt Banden bei 1500, 850, 400, 200 und 50 Basenpaaren (bp), GeneRuler bei 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50 und 25 bp.

Die Elektrophorese wurde bei 100 V, 80 mA und 25 W für 60 min durchgeführt (Spannungsquelle: Consort E834), danach wurde das Gel aus dem Puffer herausgenommen und unter UV-Licht (300 nm) betrachtet und dokumentiert.

4.5. Statistik

Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) der Ergebnisse der Permeationsuntersuchungen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test, sofern kein signifikanter Unterschied der Varianzen vorlag.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der Primärkulturen

5.1.1. Humane nasale Epithelzellen (HNE)

5.1.1.1. Primärkultivierung

Mit der beschriebenen Methode gelang es, zwischen 140.000 und 1,3 Millionen Zellen pro cm² Schleimhaut zu isolieren, im Mittel wurden 470.000 Zellen/cm² erhalten (Werte von 17 Isolierungen). In der mikroskopischen Betrachtung war nach der Aussaat nur auf kollagenbeschichteten Oberflächen eine Anheftung zu erkennen. Durchschnittlich waren nach einem Tag 39 % der ausgesäten Zellen nicht angeheftet. Die angehefteten Zellen zeigten eine epithelzellartige, pflastersteinförmige Morphologie (Abbildung 5.1), Zilientätigkeit war erkennbar.

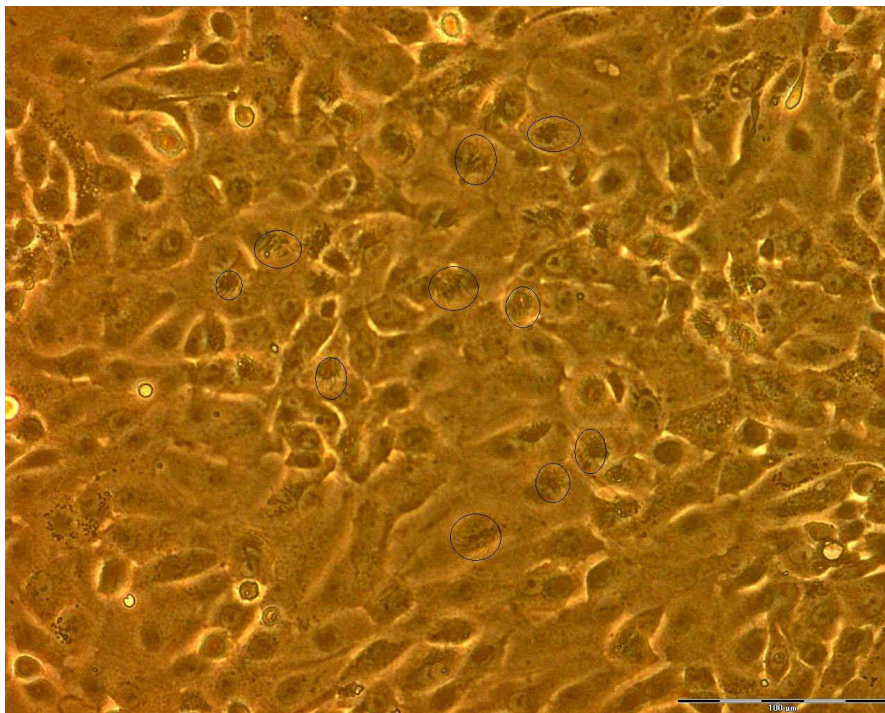


Abbildung 5.1 Isolierte humane nasale Epithelzellen in Primärkultur (6 Tage nach Aussaat), zilientragende Zellen sind beispielhaft markiert. Der Balken entspricht 100 µm.

Zur Ermittlung des optimalen Kultivierungsmediums wurde die Vitalität der Zellen nach 4-5 Tagen Kultivierung in verschiedenen Medien mittels MTT-Test bestimmt. Gegenüber dem Grundmedium zeigte der Einzelzusatz von Insulin, Transferrin, Hydrocortison, EGF oder nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA) keine signifikante Verbesserung der Vitalität (Abbildung 5.2). Die Kombination der Zusätze (mit

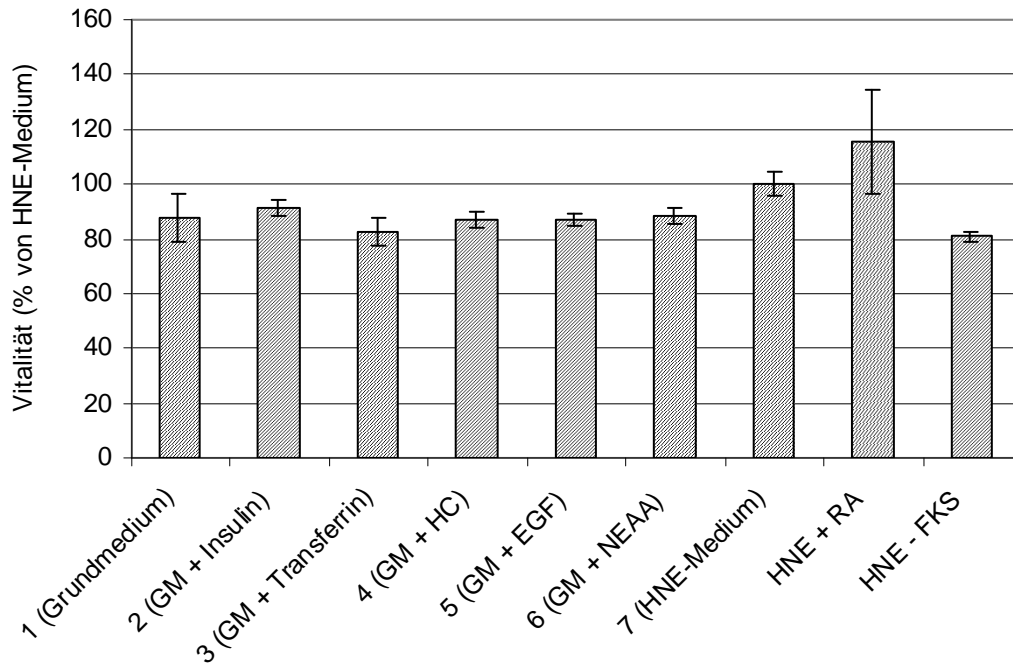


Abbildung 5.2 Vitalität von HNE in Primärkultur nach 4 Tagen Kultivierung in den angegebenen Kultivierungsmedien, ermittelt mit MTT-Test, Kollagenbeschichtung (HC: Hydrocortison, EGF: Epidermal Growth Factor, NEAA: Nichtessentielle Aminosäuren, RA: Retinolsäure, FKS: Fetales Kälberserum), MW \pm SD, n=4.

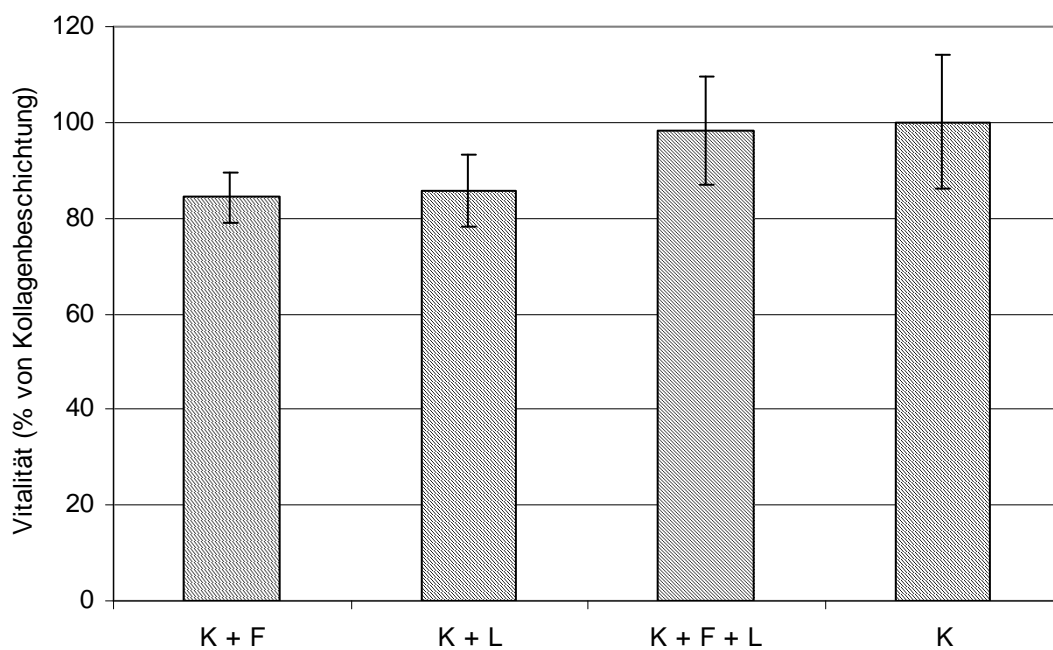


Abbildung 5.3 Vitalität von HNE in Primärkultur nach 4 Tagen Kultivierung auf den angegebenen Beschichtungen (K: Kollagen, L: Laminin, F: Fibronectin), ermittelt mit MTT-Test, HNE-Medium, MW \pm SD, n=4.

Ausnahme von NEAA) konnte die Vitalität jedoch steigern und wurde im Weiteren als HNE-Medium verwendet. Durch weiteren Zusatz von Retinolsäure (RA) stieg die durchschnittliche Vitalität weiter an, jedoch auch die Standardabweichung.

Eine Kultivierung ohne Serum scheint in der Primärkultur zwar möglich, ist jedoch mit stark schwankenden Vitalitätswerten verbunden. Die Anheftung der Zellen ist von Serum abhängig. Aufgrund der stärkeren Schwankungen bei der Kultivierung mit Retinolsäure und der Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen (sinkende Zellzahlen nach 4-6 Tagen, siehe 5.1.1.3) wurde auf diesen Zusatz verzichtet und das beschriebene HNE-Medium gewählt.

Im Hinblick auf die Beschichtung zeigte sich, dass ohne eine Kollagenbeschichtung (K) keine Anheftung erfolgte (siehe auch Wachstumsverhalten, 5.1.1.3). Eine zusätzliche Beschichtung mit Laminin (L) und/oder Fibronectin (F) brachte keine Verbesserung der Vitalität (Abbildung 5.3).

5.1.1.2. Subkultivierung

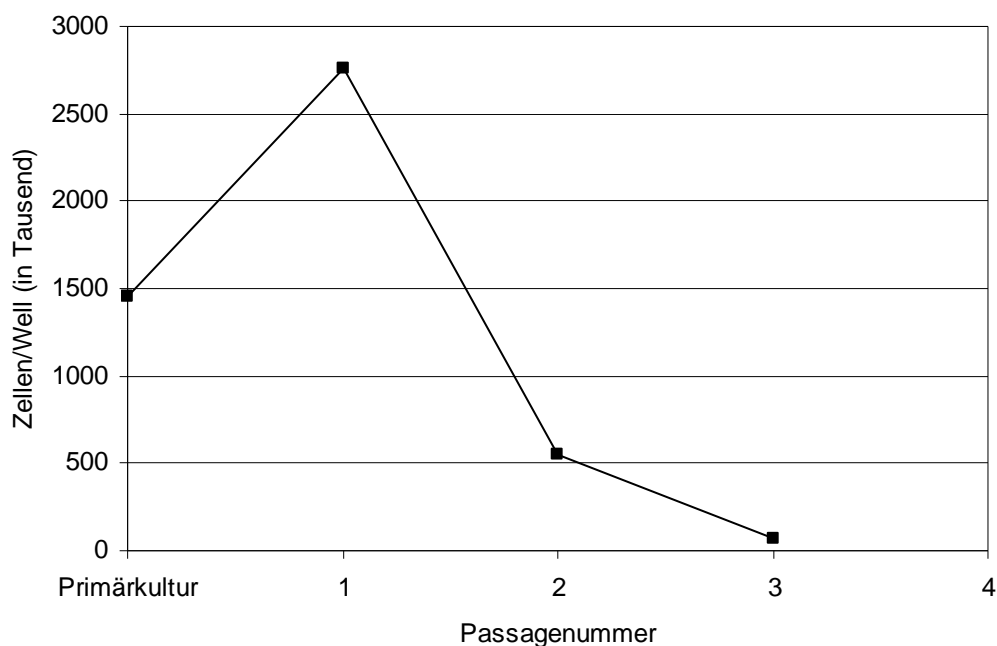


Abbildung 5.4 Passageabhängige Zellzahlentwicklung von HNE einer beispielhaften Charge, kultiviert in HNE-Medium auf kollagenbeschichteter Oberfläche, Einzelmessung.

Um eine ausreichende Menge an Epithelzellen für verschiedene Versuche zu erhalten, sollten die Zellen vermehrt und passagiert werden können. Die Zellzahl wurde über 3 Passagen hinweg jeweils beim Passagieren ermittelt und daraus die theoretisch erreichte Gesamtzellzahl berechnet (Abbildung 5.4). Bei der Kultivierung

im HNE-Medium zeigte sich eine Zunahme der Zellzahl ausgehend von der Primärkultur, wie auch mikroskopisch erkennbar war. Nach dem ersten Passagieren fiel die Zellzahl rapide ab, da die Anheftungseffizienz der vereinzelt Zellen sehr gering war und eine Vermehrung kaum noch stattfand. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich in der Primärkultur die angehefteten Zellen rasch ausdifferenzierten, z. B. zu zilienträgenden Zellen, die sich jedoch nach der Passagierung nicht weiter teilten. Die hier isolierten Epithelzellen können also nur in der Primärkultur für Versuche verwendet werden.

5.1.1.3. Wachstumsverhalten

Wachstumskurven wurden in Primärkultur in verschiedenen Medien mit und ohne Kollagen aufgenommen (siehe 4.1.6). Hierbei wurde deutlich, dass ohne Kollagenbeschichtung der Wachstumsfläche kaum Anheftung und kein Wachstum erfolgte (Abbildung 5.5). Der Serumgehalt des Mediums scheint im beobachteten Zeitraum keine Rolle zu spielen. Der Zusatz von Retinolsäure führt nach 4-6 Tagen zu einer Abnahme der Zellzahl. Retinolsäure soll die Differenzierung der Zellen fördern, so dass evt. eine weitere Zellteilung verhindert wird.

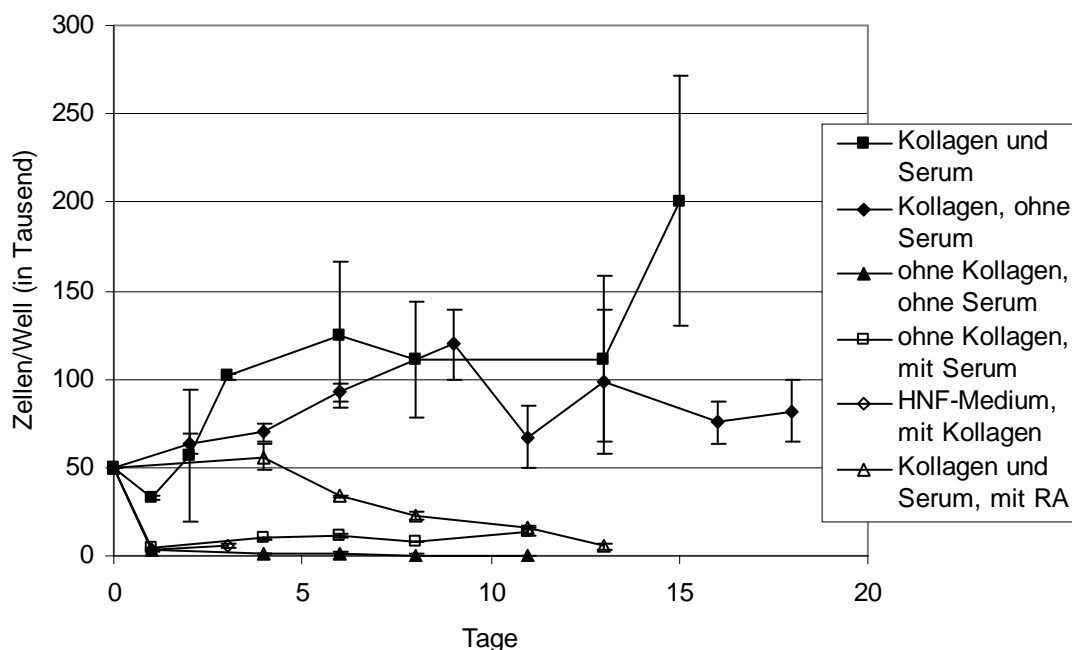


Abbildung 5.5 Wachstumskurven von HNE in Primärkultur, HNE-Medium (soweit nicht anders angegeben) (RA: Retinolsäure), MW \pm SD, n=3.

Die Kultivierung in HNF-Medium, das weniger Supplemente enthält, war nicht möglich. Nach dem ersten Passagieren wurde auch in HNE-Medium mit Kollagenbeschichtung kein Wachstum mehr festgestellt (Abbildung 5.6). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen zur Subkultivierung überein.

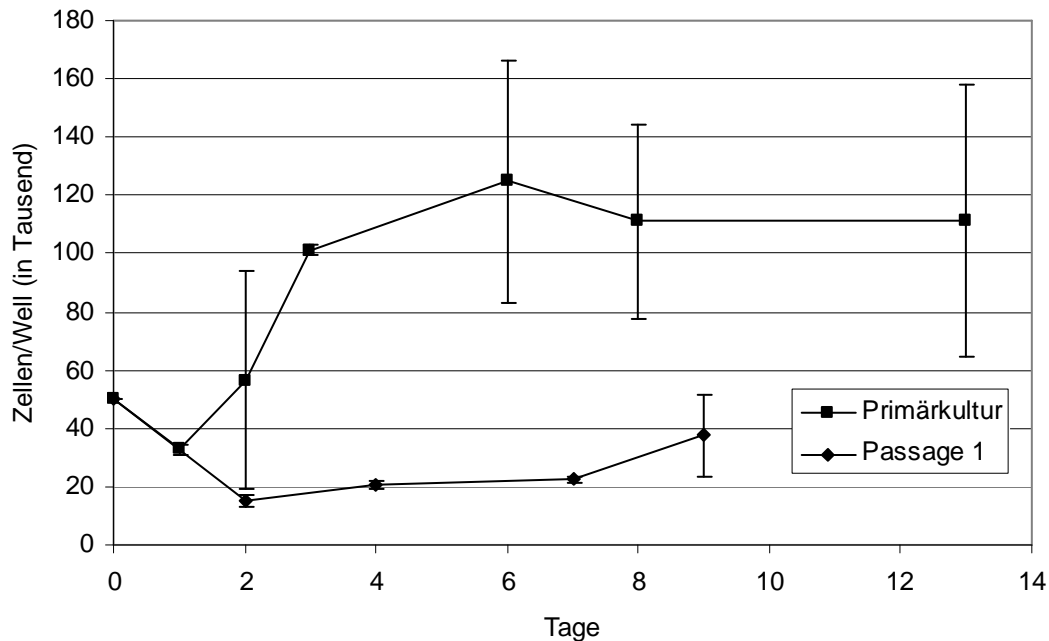


Abbildung 5.6 Wachstumskurven von HNE in Primärkultur und in Passage 1, HNE-Medium mit Kollagenbeschichtung, MW \pm SD, n=3.

5.1.1.4. TEER-Messungen

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands ist eine einfache Methode, um die Intaktheit eines Zelllayers nichtinvasiv zu bestimmen. Je dichter die insbesondere über Tight Junctions vermittelten Zell-Zell-Verbindungen sind, desto höher steigt der Widerstand.

TEER-Werte wurden wie für epitheliale Modelle beschrieben bestimmt. 200.000 HNE wurden auf einen Filter von 1,13 cm² Fläche ausgesät. Bei Untersuchungen mit und ohne Serum, mit und ohne Kollagenbeschichtung sowie mit und ohne HDF (humane dermale Fibroblasten)- bzw. HNF-Kokultur konnten keine höheren Werte als bei leeren Filtern ermittelt werden (ca. 10 $\Omega \cdot \text{cm}^2$).

TEER-Werte von Primärkulturen von HNE werden in der Literatur sehr unterschiedlich angegeben. So werden abhängig von den Kulturbedingungen Werte von 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ bis zu 3450 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Werner und Kissel, 1996)

(Polyethylenterephthalatfilter); (Agu et al., 2001) (Cellagen-Membran, Vitrogen Gel- bzw. Filmcoating); (Yoo et al., 2003) (Polyester-Filter, Passage 2 und 3 sehr hoch); (Lee et al., 2005) (Polyester-Filter, Maximum mit ALI).

Dagegen findet man für exzidierte Mukosa weit niedrigere Werte. Cotton et al. geben für exzidierte humane nasale Mukosa Werte von ca. 88-100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ an (Cotton et al., 1987), für porcine Mukosa werden Werte von 52-74 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben, wobei in dieser Untersuchung der Minimalwert für die Verwendbarkeit nicht-dermatomisierter Mukosa für Permeationsuntersuchungen auf sogar nur 30 bzw. 40 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Septum bzw. Nasenhöhle) festgelegt wird (Wadell et al., 1999).

5.1.2. Humane nasale Fibroblasten (HNF)

Humane nasale Fibroblasten sollten isoliert und kultiviert werden, um den Einfluss auf die Differenzierung der Epithelzellen in Kokultur untersuchen zu können. Sie wurden sowohl in einer kontaktlosen Kokultur als auch in einem dreidimensionalen Modell mit direktem Kontakt eingesetzt.

5.1.2.1. Primärkultivierung

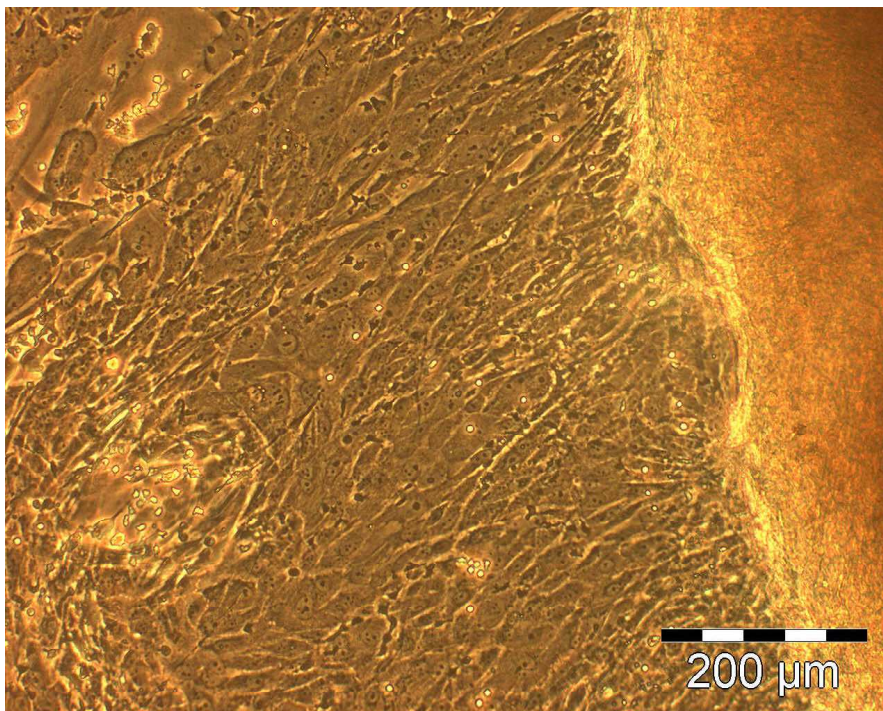


Abbildung 5.7 Auswachsene HNF in Primärkultur, 7 Tage nach Anheften der Gewebestücke. Am rechten Bildrand ist das Gewebestück zu erkennen.

HNF konnten durch Auswachsen aus Bindegewebsstücken erhalten werden. Nach ca. 1 Woche wurden die auswachsenden Zellen mikroskopisch klar erkannt

(Abbildung 5.7). Die isolierte Zellzahl schwankte je nach Zerkleinerungsgrad und Anheftung des Gewebes auf der Plastikoberfläche zwischen 32.000 und 1 Million Zellen/cm² Gewebe. Eine optimale Ausbeute ergab sich bei einer Auswachsdauer von ca. 2 Wochen.

5.1.2.2. Subkultivierung

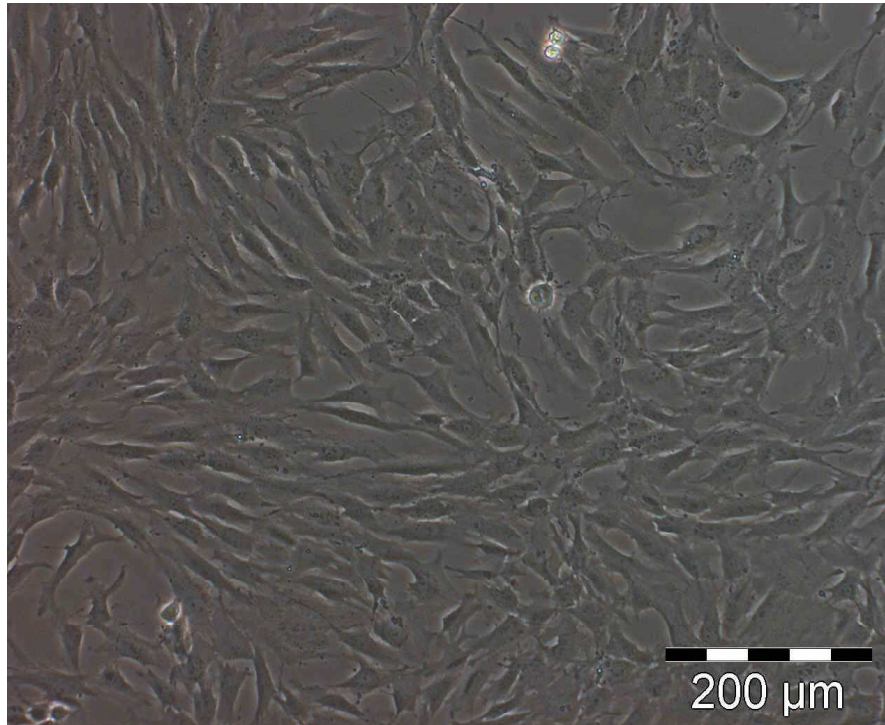


Abbildung 5.8 HNF in Passage 1.

Eine Subkultivierung der HNF war problemlos möglich (Abbildung 5.8). Die Zellzahl wurde über mehrere Passagen hinweg jeweils beim Passagieren ermittelt und daraus die theoretisch erreichte Gesamtzellzahl berechnet. Die Gesamtzellzahl der HNF stieg über ca. 10 Passagen exponentiell an (Abbildung 5.9). Danach verlangsamte sich die Zellteilung bzw. kam zum Erliegen. Auch mikroskopisch war in späteren Passagen deutlich zu erkennen, dass die Zellen weniger vital waren, z. B. ihre spindelförmige Morphologie nicht mehr vollständig ausbildeten und schlechter anhafteten. Um genauer festlegen zu können, bis zu welcher Passage die HNF verwendbar sind, wurden weitere Versuche durchgeführt.

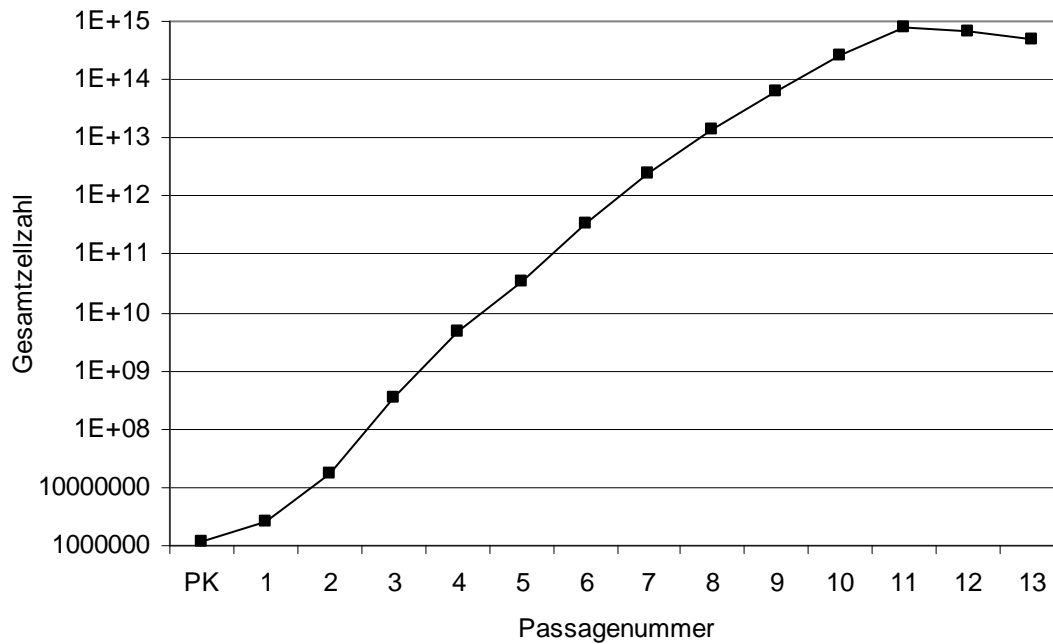


Abbildung 5.9 Passageabhängige Zellzahlentwicklung von HNF einer beispielhaften Charge, kultiviert in HNF-Medium, Einzelmessung.

5.1.2.3. Wachstumsverhalten

In Passage 1 wurden Wachstumsversuche mit verschiedenen Medien durchgeführt. In HNE-Medium mit Choleratoxin, welches zur Fibroblasten-Wachstumshemmung zugesetzt wird, war das Wachstum am geringsten. HNE-Medium ohne Choleratoxin und HNF-Medium führten zu ähnlichen Zellzahlen nach 2 Wochen, wobei das Wachstum in HNF-Medium etwas langsamer war (Abbildung 5.10). Für die weitere Kultivierung und Versuche wurde HNF-Medium gewählt, weil sich hier mikroskopisch betrachtet die Morphologie der Fibroblasten besser ausdifferenzierte.

In späteren Isolierungschargen zeigte sich ein deutlicher Vorteil von HNE-Medium ohne CT gegenüber HNF-Medium. Hier war das Wachstum in HNF-Medium vergleichbar dem Wachstum in HNE-Medium mit CT (Abbildung 5.11). Um gleichbleibende Bedingungen beizubehalten, wurden jedoch auch diese Chargen in HNF-Medium kultiviert.

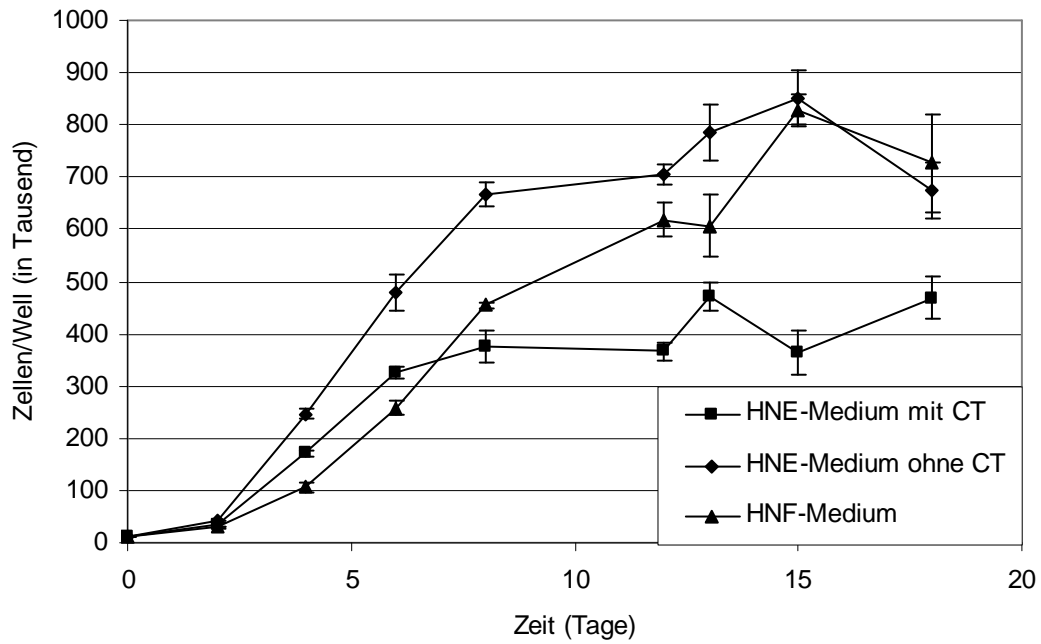


Abbildung 5.10 Wachstumskurven von HNF der ersten Isolierungscharge in Passage 1 in verschiedenen Medien (CT: Cholera toxin), MW \pm SD, n=3.

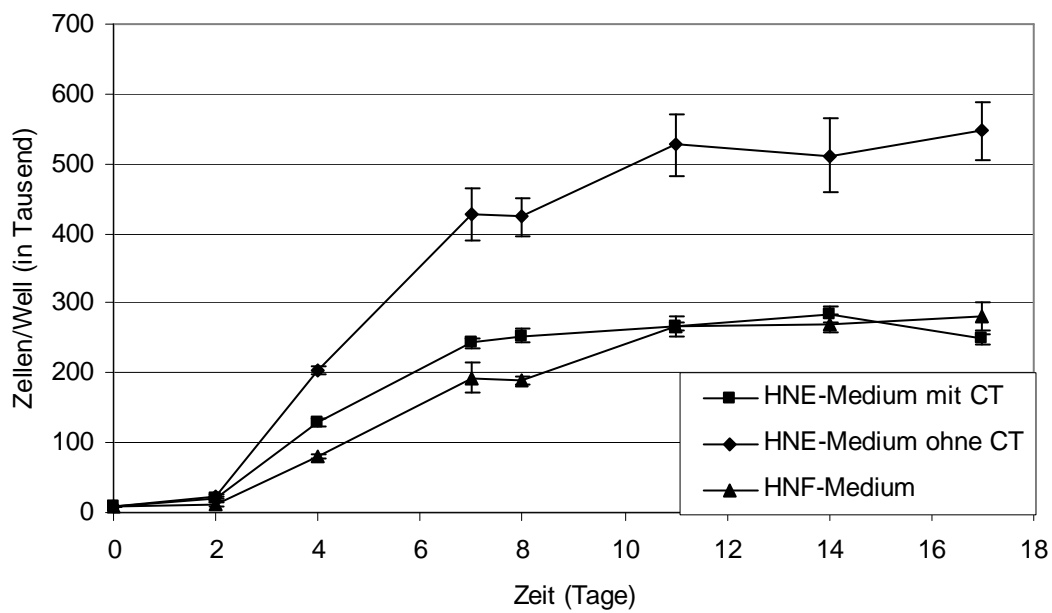


Abbildung 5.11 Wachstumskurven von HNF einer späteren Isolierungscharge in verschiedenen Medien (CT: Cholera toxin), MW \pm SD, n=3.

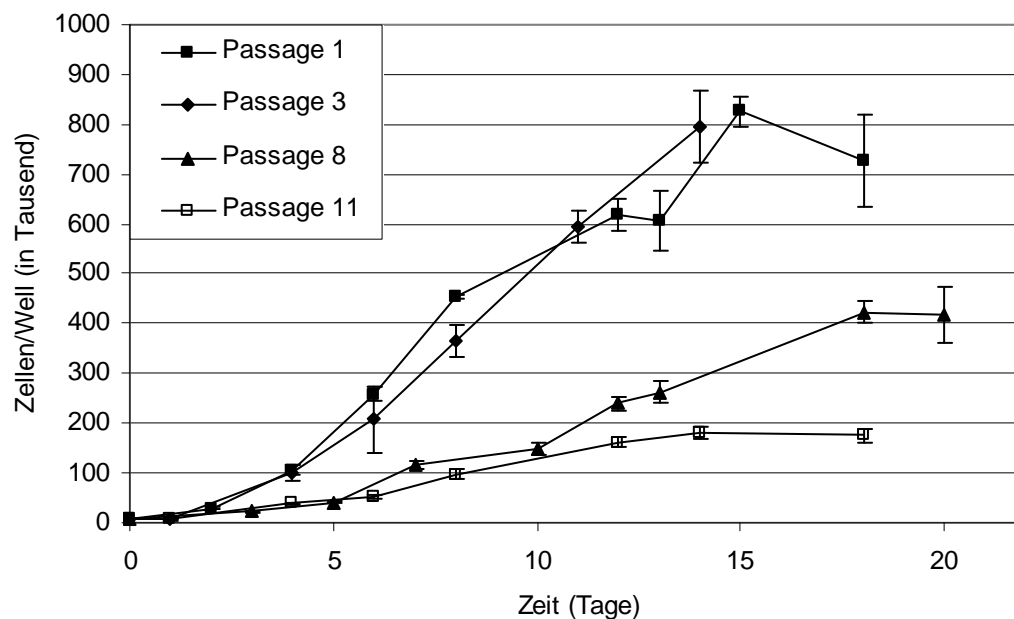


Abbildung 5.12 Wachstumskurven von HNF in HNF-Medium in verschiedenen Passagen, MW \pm SD, n=3.

Das Wachstum der HNF in verschiedenen Passagen wurde mit HNF-Medium ermittelt. Hierbei zeigte sich bis zur Passage 3 kaum eine Veränderung, in höheren Passagen verlangsamte sich das Wachstum jedoch deutlich (Abbildung 5.12). Um die Verwendbarkeit der Zellen insbesondere für die dreidimensionalen Modelle zu ermitteln, muss zusätzlich die Kollagenkontraktionskraft in den verschiedenen Passagen herangezogen werden.

5.1.2.4. Kollagenkontraktionsvermögen

Für die Verwendung der HNF in dreidimensionalen Modellen ist das Kollagenkontraktionsvermögen von großer Bedeutung. Es bestimmt die Dicke des Konstruktes bei der Verwendung im Permeationsexperiment und damit die Länge des Permeationswegs der Modellschubstanzen. Daher sollten nur Chargen und Passagen verwendet werden, die eine ähnliche Kontraktion aufwiesen.

Die Gelkontraktion nahm mit höheren Passagezahlen ab (siehe 5.4.2.2). Wie bei der Zellzahlbestimmung war eine abnehmende Vitalität der HNF zu erkennen. Bis zur Passage 4 blieb die Kontraktion in etwa gleich, danach wurde sie schwächer. Dabei war der Unterschied umso größer, je mehr Zellen im Gel inkorporiert waren. Um ausreichende Zellzahlen zur Verfügung zu haben, wurden HNF bis zur Passage 4 in Kollagengele eingearbeitet.

5.1.3. Zusammenfassende Diskussion zu Primärkulturen

Trotz Isolierung zahlreicher vitaler Epithelzellen, die sich zum größten Teil auf der kollagenbeschichteten Wachstumsoberfläche anhefteten und Zilienaktivität aufwiesen, war es nicht möglich, diese Epithelzellen für Untersuchungen zu TEER-Werten oder für Permeationen zu verwenden. Eine dafür notwendige Kultivierung auf Filtereinsätzen war nicht erfolgreich. Die Ergebnisse von Werner und Kissel, die die verwendete enzymatische Isolierung beschrieben, konnten nicht reproduziert werden (Werner und Kissel, 1995). Auch eine Passagierung der isolierten Zellen gelang nicht. Daher lag der Fokus der Arbeit im Folgenden auf dem Aufbau und der Evaluierung eines Modells mit der immortalisierten Zelllinie RPMI 2650.

Hingegen war die Isolierung und Kultivierung der humanen nasalen Fibroblasten erfolgreich. Mit der beschriebenen Methode des Auswachsens aus Gewebestücken ist es gelungen, Fibroblasten zu gewinnen, die über mehrere Passagen kultivierbar und für weitere Versuche einsetzbar sind. Entsprechende Methoden sind bereits erfolgreich z.B. bei cornealen Stromazellen (Reichl und Müller-Goymann, 2003) angewendet worden. Für nasale Fibroblasten finden sich neben dem Auswachsen auch weitere Methoden, wie z.B. eine enzymatische Dissoziation nasalen Gewebes in der Literatur (Koizumi et al., 2007; Wiszniewski et al., 2006). Eine Kultivierung in einem Medium bestehend aus DMEM, supplementiert mit 1 % L-Glutamin, 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin und 10 % FKS führte zu HNF, die mit Ausnahme einer Isolierungscharge gleichbleibende, reproduzierbare Eigenschaften über mindestens vier Passagen zeigten.

5.2. Kultivierung und Charakterisierung der Zelllinie RPMI 2650

5.2.1. Kultivierung

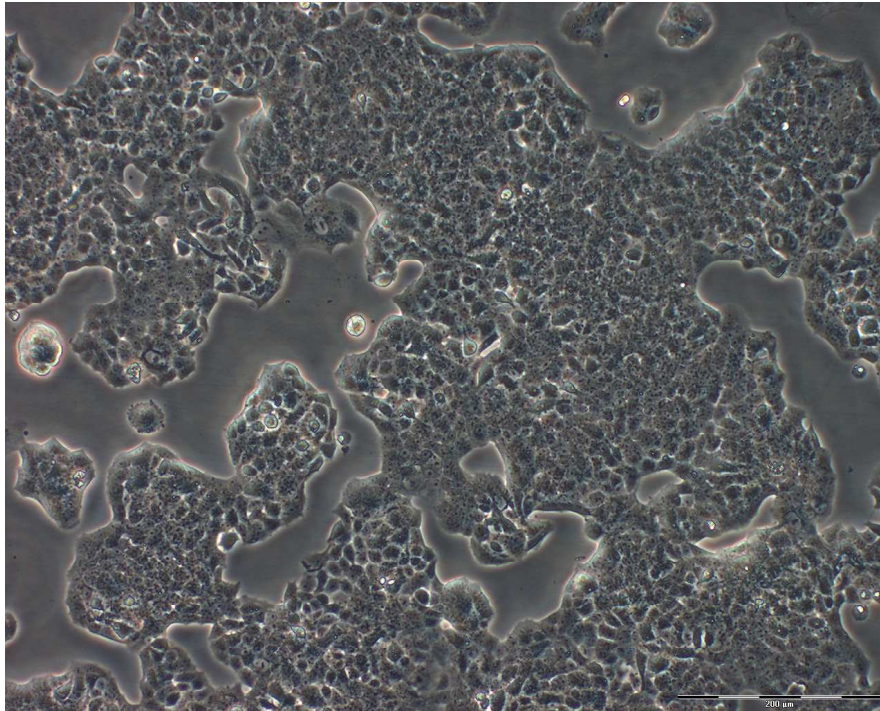


Abbildung 5.13 RPMI 2650 in submerser Kultur, RPMI-Medium, Balken entspricht 200 µm.

Die Kultivierung und Subkultivierung der RPMI 2650 Zellen waren problemlos möglich. Mikroskopisch zeigten die Zellen ein pflastersteinartiges Erscheinungsbild (Abbildung 5.13). Bei submerser Kultur wurde keine Konfluenz erreicht, sondern die Zellen wuchsen in haufenförmigen Ansammlungen, zwischen denen freie Flächen zu erkennen waren. Gleiches ist bereits früher beschrieben worden (Werner und Kissel, 1996).

5.2.2. Wachstumsverhalten

Das Wachstum von RPMI 2650 in RPMI-Medium, HNE-Medium und HNE-Medium ohne Choleratoxin war vergleichbar (Abbildung 5.14). In allen Fällen traten nach ca. 2 Wochen Kultur starke Schwankungen auf. In HNE-Medium mit Retinolsäure bzw. ohne Serum konnte kein Wachstum festgestellt werden. Beschichtungen der Wachstumsoberfläche bewirkten ein schlechteres Wachstum (Abbildung 5.15). Einzig eine reine Kollagenbeschichtung kam der unbeschichteten Oberfläche nahe, wobei hier die Zellzahl nach 2 Wochen extrem abfiel. Ein mögliches Problem bei der Kollagenbeschichtung könnte die Ablösung der Kollagenschicht bei häufigem Mediumwechsel sein, wie zum Teil beobachtet werden konnte.

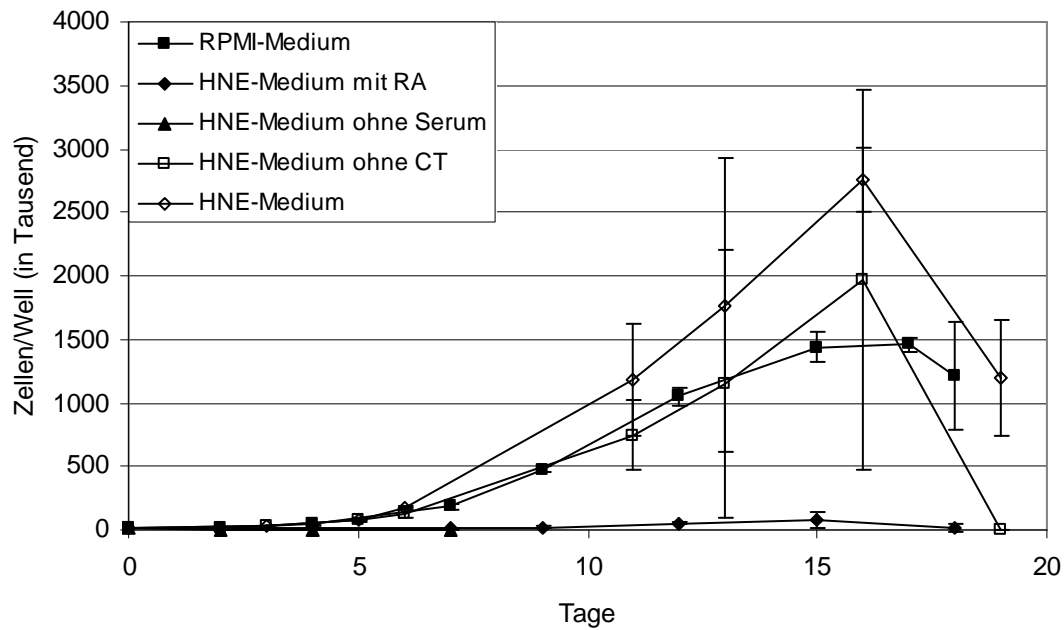


Abbildung 5.14: Wachstumskurven von RPMI 2650 in verschiedenen Medien mit verschiedenen Zusätzen (RA: Retinolsäure, CT: Choleratoxin), MW \pm SD, n=3.

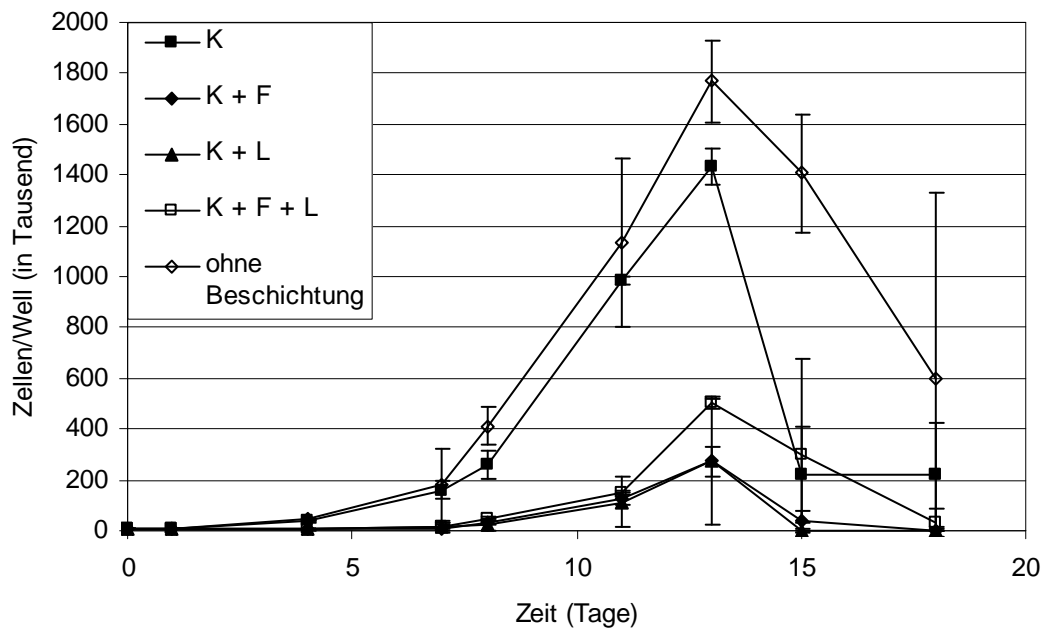


Abbildung 5.15 Wachstumskurven von RPMI 2650 in RPMI-Medium auf verschiedenen Beschichtungen (K: Kollagen, F: Fibronectin L: Laminin), MW \pm SD, n=3.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden RPMI 2650 in dieser Arbeit für die Dauerkultivierung in RPMI-Medium auf unbeschichteten Oberflächen kultiviert.

Wie bereits in der Literatur beschrieben, lassen sich RPMI 2650 in sehr einfachen Medien problemlos kultivieren (Bai et al., 2008; De Fraissinette et al., 1995a). De Fraissinette et al. beobachteten zudem einen Unterschied im morphologischen Bild zwischen Wachstumsflächen mit Kollagen- bzw. Laminin-Beschichtung und solchen mit Fibronectin-Beschichtung. Auf letzteren breiteten sich die Zellen weiter über die Fläche aus, während sie bei ersteren clusterförmig wuchsen. In dieser Arbeit konnte jedoch im Hinblick auf das Wachstum kein Vorteil der Fibronectinbeschichtung gegenüber anderen Oberflächen festgestellt werden, im Gegenteil war das Wachstum deutlich vermindert.

5.3. Charakterisierung der exzidierten Mukosa

Die Präparation der exzidierten Mukosa war mit der unter 4.2.1.1 beschriebenen Methode erfolgreich. Dabei konnten je erhaltener Gewebespende bis zu drei für Permeationsuntersuchungen geeignete Stücke erhalten werden.

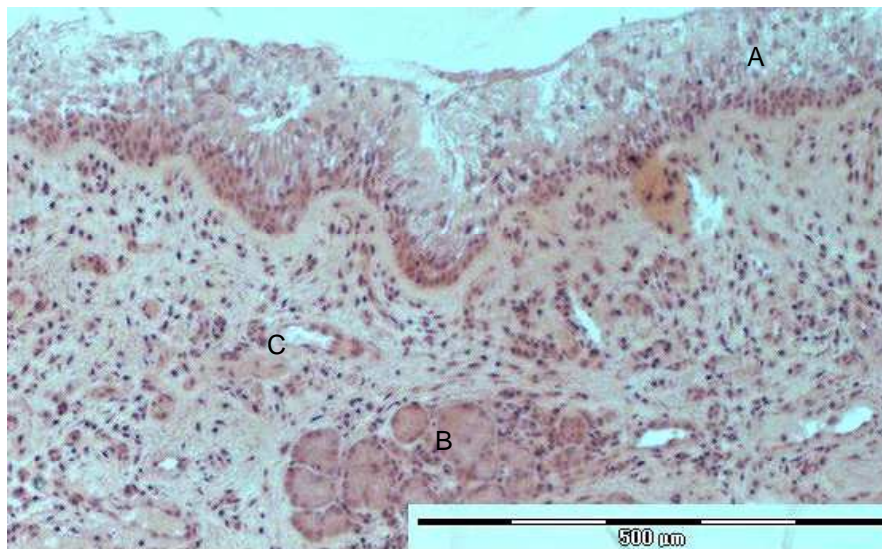


Abbildung 5.16 Schnitt durch nasale Mukosa (HE-Färbung), zu erkennen ist das Epithel (A) mit dem darunterliegenden Bindegewebe mit Drüsen (B) und Gefäßen (C).

Wie auf Abbildung 5.16 zu erkennen, waren auch mikroskopisch die bekannten Strukturen der nasalen Mukosa nachweisbar. Deutlich zu erkennen ist das hochprismatische Epithel, wobei die Zilien in dieser Präparation nicht dargestellt werden konnten. Darunter sieht man das Bindegewebe mit Drüsensystemen und Gefäßen.

5.4. Aufbau, Kultivierung und Charakterisierung der Permeationsmodelle

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, aufbauend auf die humane immortalisierte Zelllinie RPMI 2650 ein geeignetes Modell der humanen nasalen Mukosa für Permeationsuntersuchungen zu entwickeln. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zunächst wurde ein einfaches epitheliales Modell entwickelt, welches nur aus Epithelzellen besteht. Da eine Kokultivierung mit Fibroblasten in anderen Fällen zu einer Verbesserung der Differenzierung geführt hatte (Koizumi et al., 2007; Le Visage et al., 2004; Wiszniewski et al., 2006), sollte nun zusätzlich eine kontaktlose Kokultur im epithelialen Modell untersucht werden. Da das nasale Epithel in vivo nicht von einer Flüssigkeitsschicht wie in submerser Kultur bedeckt ist, sollten die Modelle auch an der Luft-Medium-Grenze kultiviert werden (Air-Liquid-Interface, ALI). Diese Methode wurde bereits als eine Möglichkeit beschrieben, die Differenzierung humaner nasaler Epithelzellen in Primär- und Sekundärkultur besser als durch submerse Kultivierung zu induzieren (Lee et al., 2005; Lin et al., 2007b; Yeh et al., 2007).

Im nächsten Schritt sollte dann ein komplexeres, dreidimensionales Modell aufgebaut werden, bestehend aus einem Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten, auf dem in direktem Kontakt die Epithelzellen wachsen.

5.4.1. Epitheliale Modelle der nasalen Mukosa

Mit der beschriebenen Methode (siehe 4.2.2.1) war eine Kultivierung der Modelle möglich. Zu beachten war, dass beim Mediumwechsel, insbesondere beim Entfernen des verbrauchten Mediums, der Zellrasen nicht beschädigt werden durfte. Mit fortschreitender Kultivierungsdauer zeigten sich die Modelle empfindlicher. Besonders die Modelle auf kollagenbeschichteter Oberfläche neigten zum Ablösen.

Die RPMI 2650 Zellen auf Polycarbonat-Filtern wurden während der Kultivierung mikroskopisch beobachtet, insbesondere die freie Fläche auf dem Filter. Submers kultivierte Zellen wuchsen in Haufen, wie auch in den Kulturflaschen. Zellen, deren Filter an die Luft-Medium-Grenze gesetzt worden war, zeigten ein anderes Wachstumsverhalten, sie breiteten sich kontinuierlich über die freie Filterfläche aus. In Abbildung 5.17 erkennt man in Querschnitten von epithelialen Modellen diesen deutlichen Unterschied. Submerse Kulturen zeigten einen flachen, lückenhaften Multilayer, während ALI-Kulturen sich durch einen geschlossenen und homogenen

Multilayer mit 10 bis 15 Schichten auszeichneten. Dieser Multilayer entsprach in seinem Aufbau zwar nicht genau dem hochprismatischen, mehrreihigen respiratorischen Epithel, aber er zeigte eine Differenzierung ausgehend von Zellen direkt auf dem Filter hin zu Zellen an der Oberfläche, die in direktem Luftkontakt standen.

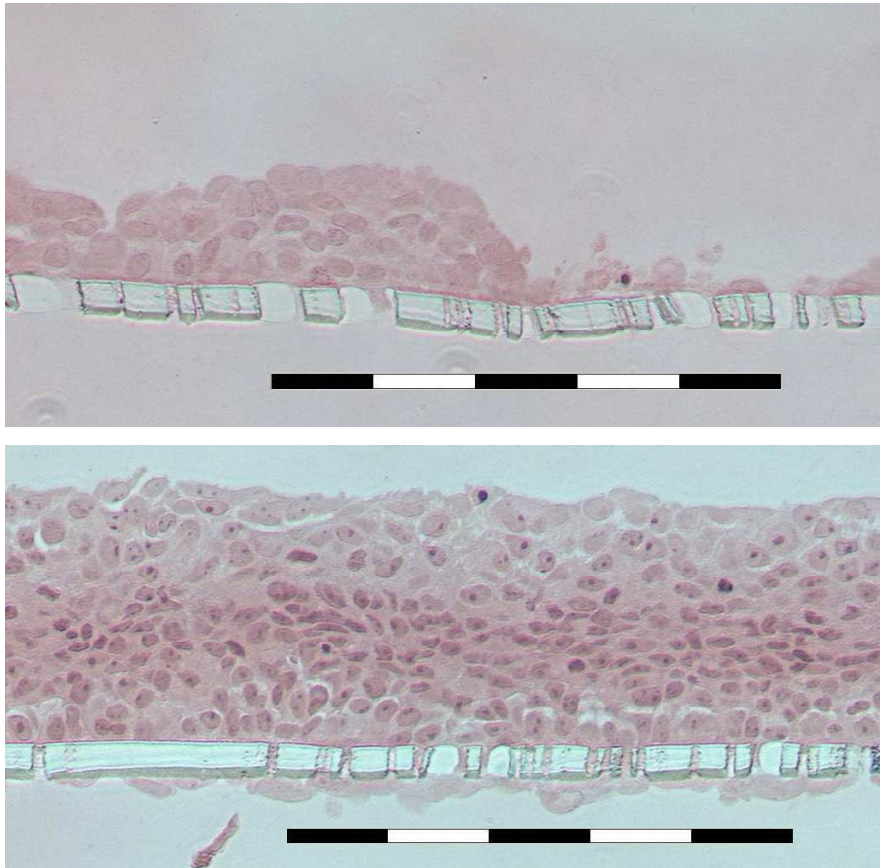


Abbildung 5.17 Querschnitte durch epitheliale Modelle aus RPMI 2650 auf Transwell Filtereinsätzen, 3 Wochen nach Aussaat. Oben: submerse Kultur, unten: ALI-Kultur. HE-Färbung. Balken entspricht 200 µm.

Der deutliche Unterschied zwischen submerser und ALI-Kultur stimmt mit Beobachtungen überein, die in der Literatur zu finden sind. Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze induziert die Differenzierung von humanen nasalen Epithelzellen in Primärkultur besser als submerse Kultur (Lee et al., 2005; Lin et al., 2007a; Yeh et al., 2007). Frühere Publikationen über RPMI 2650, die nur submers kultiviert wurden, kommen folgerichtig zu dem Schluss, dass diese Zelllinie nicht für Permeationsmodelle geeignet sein kann (De Fraissinette et al., 1995a; Werner und Kissel, 1996). Eine jüngere Studie von Bai et al. postuliert bereits, dass auch RPMI 2650 Zellen an der Luft-Medium-Grenze einen konfluenten Monolayer und

ausreichenden transepithelialen elektrischen Widerstand ausbilden können, um eine angemessene Permeationsbarriere auszubilden (Bai et al., 2008).

Eine kontaktlose Kokultur mit humanen nasalen Fibroblasten führte zu einem morphologisch gleichen Wachstums- und Differenzierungsverhalten.

5.4.2. Dreidimensionale Modelle der nasalen Mukosa

5.4.2.1. Aufbau und Kultivierung der Modelle

Der Aufbau und die Kultivierung der dreidimensionalen Modelle sind mit der beschriebenen Vorgehensweise gelungen. Zu beachten ist bei der Aussaat der Epithelzellen auf die Kollagengele, ein Herunterlaufen des Suspensionstropfens auf den Filter zu vermeiden, weil sonst das entstehende Konstrukt zum Teil auch von unten mit Epithelzellen bewachsen wird (Abbildung 5.21). Eine solche zusätzliche Epithelschicht und Permeationsbarriere beeinflusst die Ergebnisse der TEER-Messungen und Permeationen deutlich.

Im weiteren Verlauf der Kultivierung muss bei hohen Zellzahlen der Mediumwechsel häufiger erfolgen, da insbesondere nach dem Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze sonst zu wenig frisches Medium zur Verfügung steht.

5.4.2.2. Einfluss verschiedener HNF-Chargen, -Zellzahlen und -Passagen auf die Gelkontraktion

Neben dem Wachstumsverhalten ist die Kontraktion der Kollagengele mit inkorporierten HNF ein weiteres Maß für die Aktivität der Fibroblasten. Sie gibt zudem einen Anhaltspunkt, ob in verschiedenen Chargen und Passagen gleichbleibende Eigenschaften vorhanden sind. Vorteilhaft ist, dass die Messung nichtinvasiv während der Kultivierung der dreidimensionalen Modelle erfolgen kann.

HNF-Chargen

HNF aus der Isolierungscharge 1 zeigten insgesamt eine höhere Kontraktionskraft als spätere Chargen. Für Versuche wurden die Chargen 1-4 verwendet. Am Beispiel von 50.000 HNF je Konstrukt und Passage 6 wird in Abbildung 5.18 dargestellt, dass HNF aus den Chargen 2 (Durchmesser 1,45 cm nach 2 Wochen), 3 (1,35 cm) und 4 (1,6 cm) eine sehr ähnliche Kontraktion der Gele bewirkten, während HNF der Charge 1 eine deutlich stärkere Kontraktion (0,9 cm nach 2 Wochen) hervorriefen. Das gleiche Bild zeigte sich bei 25.000 und 100.000 HNF je Konstrukt und auch in anderen Passagen. HNF der Charge 1 wurden daher nur für Vorversuche verwendet.

HNF-Zellzahlen

Es wurden Konstrukte mit 0, 25.000, 50.000 bzw. 100.000 HNF aufgebaut und vermessen. Am Beispiel von HNF aus der Charge 2 in Passage 4 ist deutlich zu erkennen, dass Konstrukte ohne HNF sich nicht kontrahierten, während höhere HNF-Zahlen jeweils zu kleineren Durchmessern der Konstrukte führten (Abbildung 5.19). Konstrukte mit 100.000 HNF maßen nach 2 Wochen durchschnittlich nur 0,825 cm im Durchmesser, 50.000 HNF kontrahierten zu 1,325 cm, 25.000 HNF zu 1,675 cm. Andere Chargen zeigten ähnliche Kontraktionskraft, Charge 1 jeweils etwas stärkere (s.o.). Für Permeationsversuche wurde eine HNF-Zahl von 50.000 je Konstrukt als optimal betrachtet, weil die Kontraktion zu einem gut handhabbaren Konstrukt führte, das sowohl stabil als auch groß genug war, um sich in die Ussing-Kammern einspannen zu lassen.

HNF-Passagen

Am Beispiel von HNF der Charge 2 wird die Kontraktion von Konstrukten mit jeweils 50.000 HNF dargestellt (Abbildung 5.20). Nach 2 Wochen waren die Kollagengele der Passage 4 auf 1,325 cm kontrahiert, der Passage 6 auf 1,45 cm, der Passage 8 auf nur 1,9 cm und der Passage 10 auf 1,85 cm. Niedrigere Passagen als Passage 4 werden nicht dargestellt, weil kein Unterschied zu Passage 4 zu erkennen war. HNF wurden für Konstrukte bis zur Passage 4 verwendet.

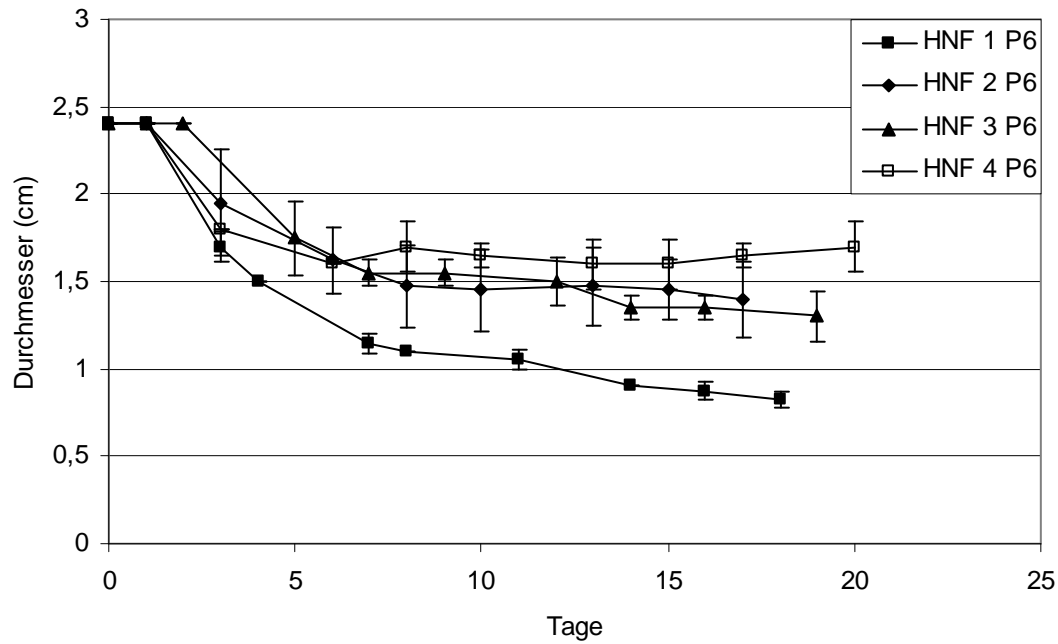


Abbildung 5.18 Einfluss verschiedener Isolierungschargen von HNF auf die Kontraktion der Kollagengele. Es wurden jeweils 50.000 HNF der Passage 6 je Gel inkorporiert. MW \pm SD, n=4.

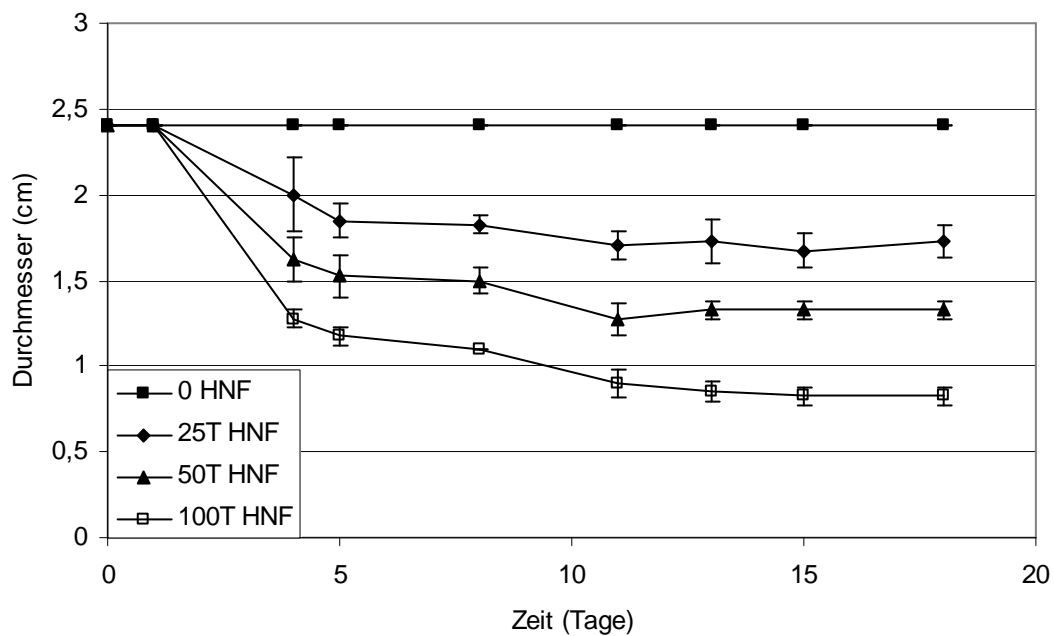


Abbildung 5.19 Einfluss verschiedener inkorporierter HNF-Zellzahlen (T: Tausend) je Gel auf die Gelkontraktion. Es wurden HNF der Charge 2 in Passage 4 verwendet. MW \pm SD, n=4.

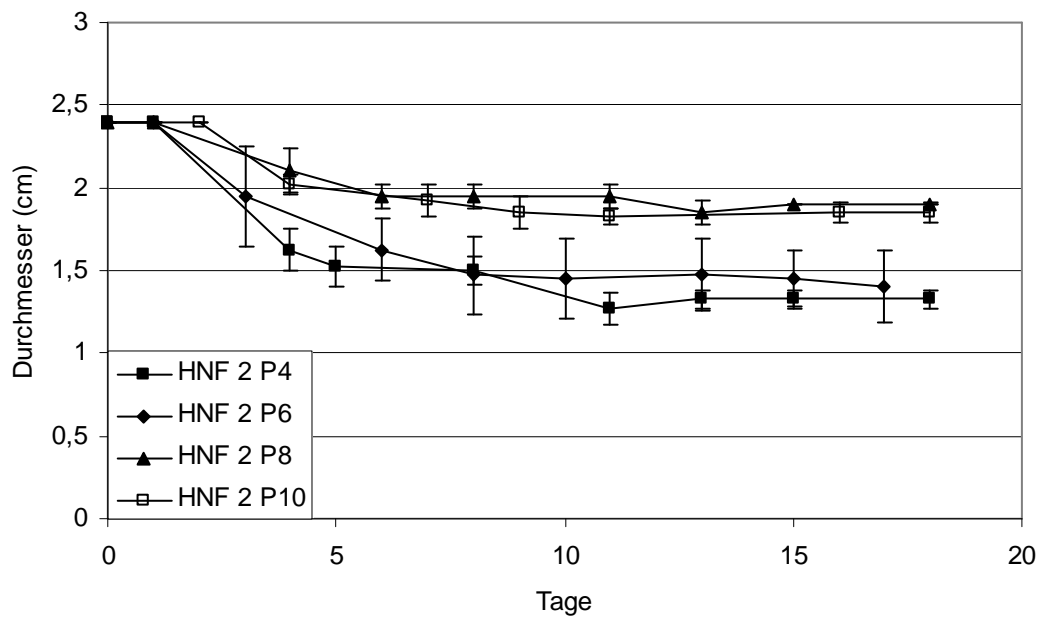


Abbildung 5.20 Einfluss verschiedener Passagezahlen auf die Kontraktion der Kollagengele. Es wurden jeweils 50.000 HNF der Charge 2 je Gel inkorporiert. MW \pm SD, n=4.

5.4.2.3. Mikroskopie

Konstrukte wurden wie beschrieben (siehe 4.2.3.3) nach Abschluss der Kultivierung fixiert, eingebettet, geschnitten und gefärbt. In den Abbildungen sind Konstrukte mit 25.000, 50.000 und 100.000 HNF zu sehen (Abbildung 5.22-Abbildung 5.24). Es wurden jeweils 200.000 RPMI 2650 verwendet. Sowohl bei Konstrukten mit 50.000 HNF als auch mit 100.000 HNF bildeten die Epithelzellen einen geschlossenen Multilayer mit mindestens 10 Zellschichten aus. Bei Konstrukten mit nur 25.000 HNF waren dagegen Lücken in diesem Epithel erkennbar. Diese Konstrukte hatten aufgrund ihrer geringeren Kontraktion eine größere Oberfläche, die im Kultivierungszeitraum nicht vollständig überwachsen wurde. Auch dies spricht für die Verwendung von mindestens 50.000 HNF je Konstrukt. Größere HNF-Zahlen führten zu Konstrukten mit sehr kleinem Durchmesser. Hier ist das Risiko hoch, dass beim Aufsäen der Epithelzellen Zellsuspension an die Unterseite des Konstruktes gelangt und dieses auch von unten mit Epithelzellen bewachsen wird (Abbildung 5.21). Der Epithelzellmultilayer zeigte mikroskopisch den gleichen Aufbau wie der Multilayer im reinen Epithelmodell auf Transwell-Filtereinsätzen (siehe 5.4.1).



Abbildung 5.21 Querschnitt der Unterseite eines Konstrukts aus 50T HNF und 200T RPMI 2650, 3 Wochen nach Aussaat der Epithelzellen. Auf der Unterseite sind ebenfalls Epithelzellen angewachsen.

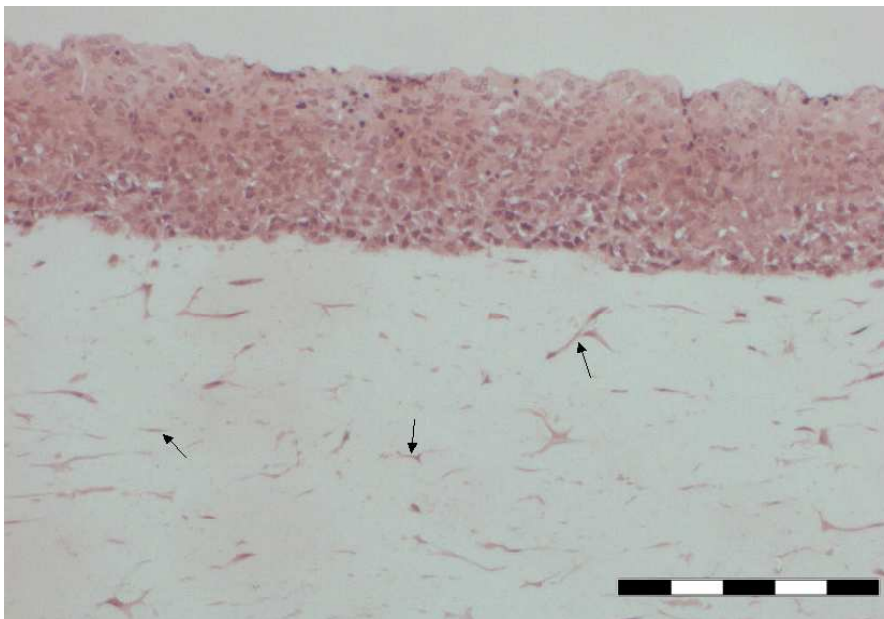


Abbildung 5.22 Querschnitt der Oberseite eines Konstrukts aus 100T HNF und 200T RPMI 2650, 3 Wochen nach Aussaat der Epithelzellen. Inkorporierte HNF sind mit Pfeilen markiert. Balken entspricht 200 μm .

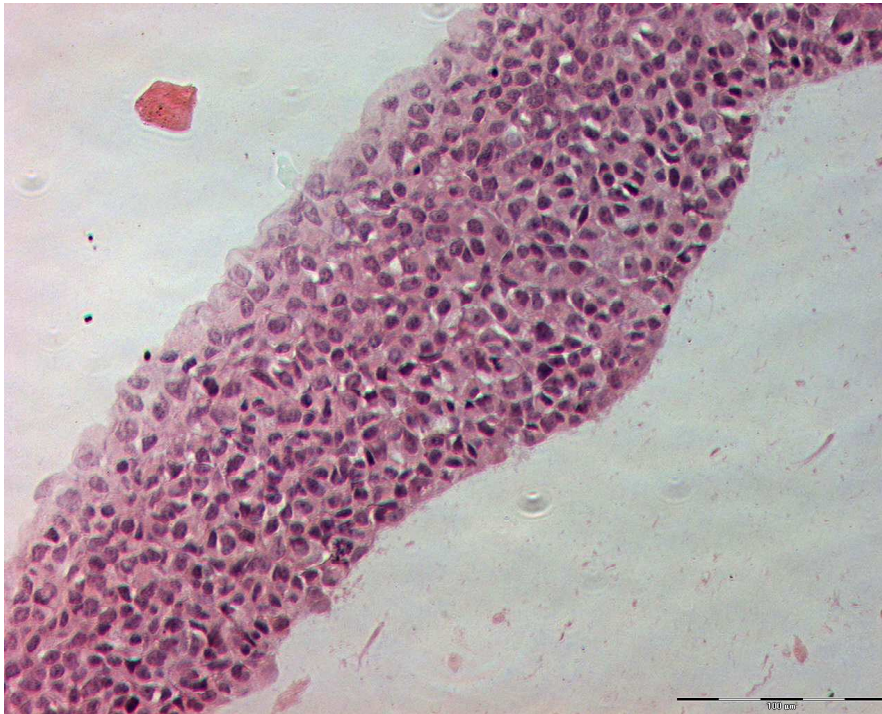


Abbildung 5.23 Querschnitt der Oberseite eines Konstrukts aus 50T HNF und 200T RPMI 2650, 3 Wochen nach Aussaat der Epithelzellen. Balken entspricht 100 μm .

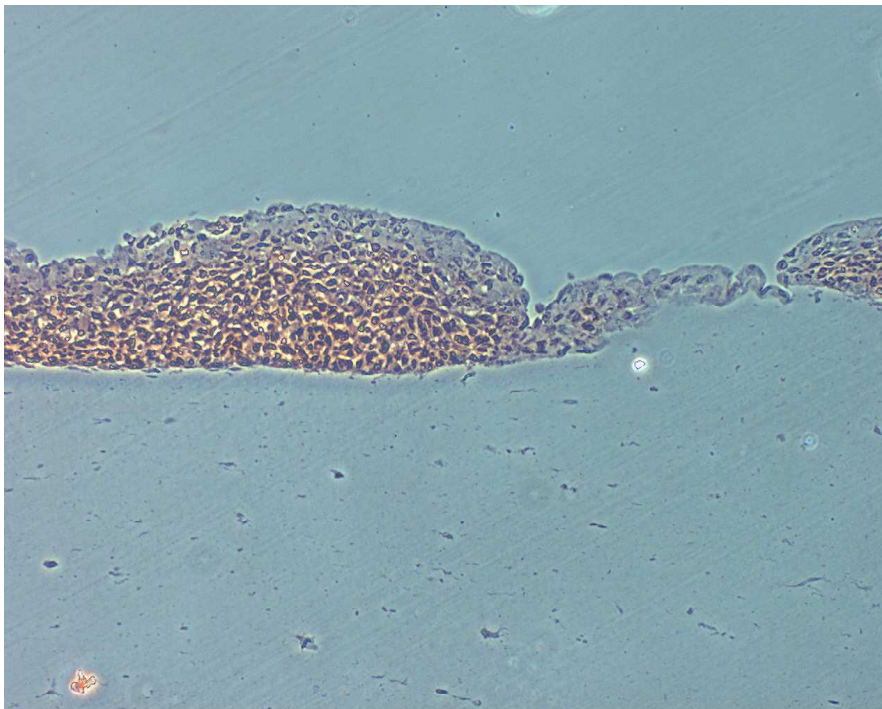


Abbildung 5.24 Querschnitt der Oberseite eines Konstrukts aus 25T HNF und 200T RPMI 2650, 3 Wochen nach Aussaat der Epithelzellen.

5.4.3. Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung und Charakterisierung der Permeationsmodelle

Zunächst wurde ein einfaches Epithelmodell, bestehend aus RPMI 2650 auf einem Polycarbonatfilter, aufgebaut. Hierbei zeigte sich ein markanter Unterschied zwischen submerser Kultur und Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze (ALI). Submerse Kulturen resultierten in clusterförmig wachsenden Zellen, die auf der Filterfläche keine Konfluenz erreichten. ALI-Kulturen hingegen erreichten konfluentes Wachstum und zeigten in einem Multilayer von 10-15 Zellschichten eine gewisse Differenzierung.

Die Stimulierung der Differenzierung von Epithelzellen durch Kontakt mit Luft ist bereits beschrieben worden, auch für nasale Zellen (Lee et al., 2005; Lin et al., 2007a; Yeh et al., 2007). Für RPMI 2650 ist dies erst in einer jüngeren Studie von Bai et al. nachgewiesen worden (Bai et al., 2008). Dort wurden PE- bzw. PTFE-Filter mit Kollagen- bzw. Kollagen-Fibronektin-Beschichtung untersucht. In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich die Beobachtung der genannten Autoren auch für Polycarbonat-Filter, die nicht zusätzlich behandelt werden mussten.

Insbesondere sollte auch der Einfluss humaner nasaler Fibroblasten in kontaktloser sowie Kontakt-Kokultur auf die Differenzierung und Barriereigenschaften der Modelle untersucht werden. Beide Kokultivierungsmethoden sind bereits als förderlich für die Differenzierung verschiedener, z. B. nasaler, weiterer respiratorischer oder auch dermalen und cornealen Epithelzellen beschrieben worden (Deterding et al., 1996; el-Ghalbzouri et al., 2002; Koizumi et al., 2007; Kumar et al., 2005; Le Visage et al., 2004; Ohji et al., 1994; Rubin, 2007; Toropainen et al., 2001; Werner und Smola, 2001; Wiszniewski et al., 2006).

Hierfür wurde zum einen das Epithelmodell in einer kontaktlosen Kokultur mit HNF kultiviert, zum anderen ein dreidimensionales Modell aus Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten und Epithelschicht entwickelt. Die Eignung der HNF für dieses Modell wurde unter anderem mit Hilfe der Kontraktion des Kollagengels bewertet. HNF aller Isolierungschargen zeigten bis zu Passage 4 ein gleichbleibendes Kontraktionsvermögen. In angefärbten Schnitten der Konstrukte waren deutlich inkorporierte, spindelförmige HNF sowie eine Epithelschicht, vergleichbar der im epithelialen Modell, zu erkennen. Mikroskopisch war hier kein Einfluss der HNF auf die Differenzierung der Epithelzellen zu beobachten.

Le Visage et al. beschreiben eine direkte Kokultur von mesenchymalen Stammzellen mit respiratorischen Epithelzellen, die zu einer besseren Differenzierung insbesondere in Mucin-produzierende Zellen führt (Le Visage et al., 2004). Koizumi et al. verwendeten primäre humane nasale Epithelzellen und Fibroblasten in einem kontaktlosen Kokultur-Modell und berichten über stärkere Ausprägung von zilientragenden Zellen sowie eine höhere Expression von Tight Junction-Proteinen. Sie schließen daraus auf lösliche Stoffe, die von den Fibroblasten sezerniert werden und die Differenzierung der Epithelzellen anregen (Koizumi et al., 2007). Deterding et al. beschreiben beispielsweise eine erhöhte Proliferation der Epithelzellen durch aFGF (acid fibroblast growth factor) und KGF (keratinocyte growth factor) (Deterding et al., 1996). Verschiedenste Faktoren, die das Zusammenspiel von Epithel, Endothel und weiteren Zellarten steuern, werden von Kumar et al. beschrieben (Kumar et al., 2005). Eine direkte Kokultur wird z. B. von Wiszniewski et al. beschrieben, die ebenfalls mehr zilientragende Zellen als ohne Fibroblasten finden. Die dort beschriebene entwickelte Kokultur von respiratorischen Epithelzellen und Fibroblasten soll über Monate als respiratorisches (hochprismatisches, mehrreihiges) Flimmerepithel stabil bestehen bleiben (Wiszniewski et al., 2006).

Auch für Keratinozyten ist von el-Ghalbzouri et al. eine Differenzierungs- und Wachstumsförderung durch Fibroblasten in Kokultur beschrieben worden (el-Ghalbzouri et al., 2002). Die Kokultur in einem Kollagen-basierten dreidimensionalen System wird in verschiedenen organotypischen In-vitro-Permeationsmodellen beschrieben (Hoffmann, 2006; Reichl, 2003).

In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich bis hierher anhand der morphologischen Daten kein deutlicher Vorteil der Kokultur gegenüber der reinen Epithelzellkultur, zum Teil zeichnen sich die Kokulturen eher durch größere Schwankungen aus. Betrachtet man die dreidimensionalen Konstrukte, so bewirken die Fibroblasten aber zumindest eine bessere Handhabbarkeit aufgrund höherer mechanischer Stabilität. Ein entscheidender Unterschied gegenüber den zitierten Publikationen ist der Ursprung der Epithelzellen. Alle erwähnten Studien arbeiteten mit Primärkulturen oder passagierten Kulturen von isolierten humanen nasalen Epithelzellen, während in dieser Arbeit eine immortalisierte Zelllinie verwendet wurde. Möglich ist, dass diese Zellen nicht mehr im gleichen Maße auf Wachstumsfaktoren reagieren, die von den Fibroblasten sezerniert werden. Es bleibt aber zu untersuchen, ob im Hinblick auf andere Eigenschaften, wie z. B. Expression von Transportern, Enzymen oder

Ausprägung von Zell-Zell-Kontakten und damit der Permeabilität des Epithels, die Kokultur nicht doch einen Vorteil bietet.

5.5. Transepithelialer elektrischer Widerstand der Permeationsmodelle (TEER)

Die Messung des TEER-Wertes ist eine einfache, schnelle und nichtinvasive Methode, die Intaktheit einer (Zell-)Barriere zu bestimmen. Die entwickelten Modelle können so bereits vor der Permeation geprüft und eingeordnet werden, ob sie eine akzeptable Permeationsbarriere ausgebildet haben. So kann entschieden werden, ob ein Modell für weitere Untersuchungen geeignet ist.

5.5.1. Exzidiertes humanes Gewebe

Für exzidiertes humanes Gewebe wurden mit der beschriebenen Methode (siehe 4.2.1.3) in Ussing-Kammern TEER-Werte von 89 bis 182 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ gefunden, wobei der Mittelwert bei $128 \pm 35 \Omega \cdot \text{cm}^2$ lag ($n=4$).

5.5.2. Epitheliale Modelle mit RPMI 2650

5.5.2.1. Einfluss von Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze

Die Ausprägung eines akzeptablen TEER-Wertes war vor allem davon abhängig, dass die Modelle an die Luft-Medium-Grenze angehoben wurden. In den folgenden Diagrammen, die jeweils auch andere Abhängigkeiten darstellen, ist zu sehen, dass submers kultivierte Modelle über den gesamten Beobachtungszeitraum Werte von unter 20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ entwickelten, während hochgesetzte Modelle bis zu 80 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ erreichten.

5.5.2.2. Verlauf über die Zeit

Abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt das Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze erfolgte, stieg der TEER-Wert verschieden früh an. Im Diagramm ist dies dargestellt für eine Kultivierung im RPMI-Medium ohne Beschichtung des Filters (Abbildung 5.25). Das Ausbilden eines konfluenten Zelllayers auf der Filterfläche und damit das Ansteigen des TEER-Wertes begann jeweils nach dem Tag des Hochsetzens. Das Standardmodell wurde eine Woche nach der Aussaat der Epithelzellen angehoben.

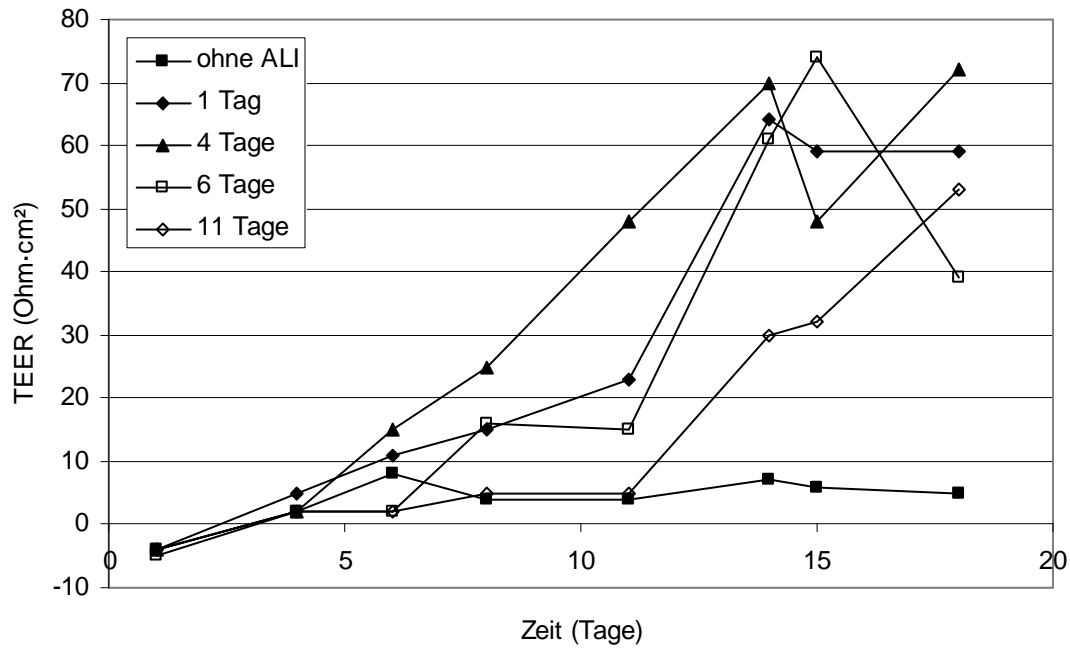


Abbildung 5.25 TEER von RPMI 2650 (in $\Omega \cdot \text{cm}^2$) auf Transwell-Filtereinsätzen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Hochsetzens an die Luft-Medium-Grenze (ALI) (Tage nach Aussaat). Jeweils 200.000 ausgesäte Zellen, ohne Beschichtung, Einzelmessung.

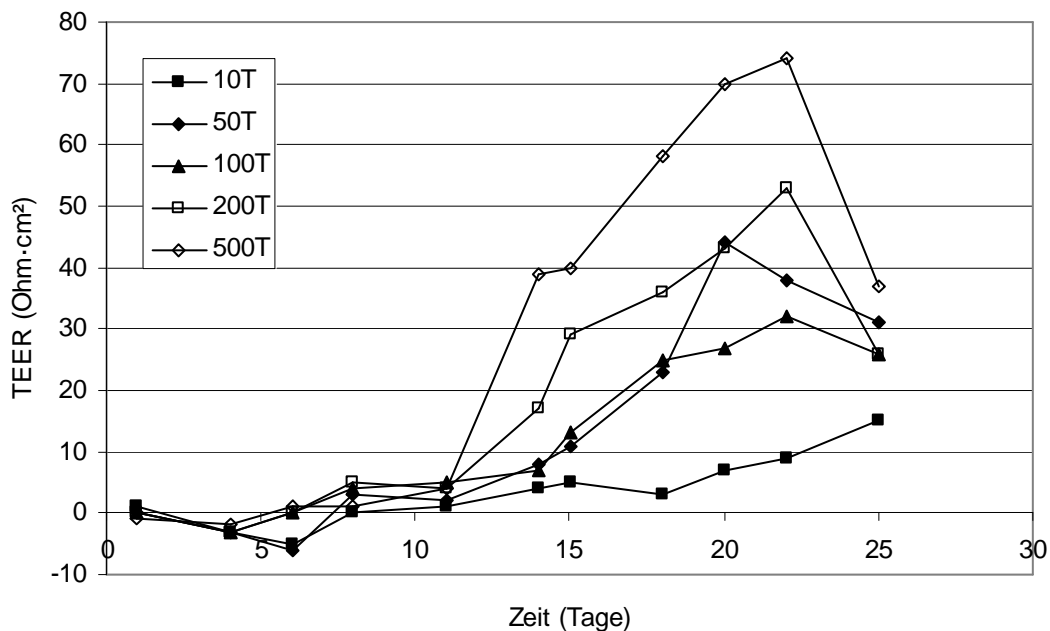


Abbildung 5.26 TEER von RPMI 2650 (in $\Omega \cdot \text{cm}^2$) auf Transwell-Filtereinsätzen in Abhängigkeit von der ausgesäten Zellzahl (T: Tausend). Jeweils Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze an Tag 8, Kollagenbeschichtung, Einzelmessung.

5.5.2.3. Einfluss von Epithelzellzahlen

Um eine geeignete Zellzahl für das Epithelmodell zu ermitteln, wurden verschiedene Zellzahlen auf Transwell Filtereinsätze von 1,13 cm² Fläche ausgesät und der TEER-Wert über 4 Wochen regelmäßig gemessen. Die für kollagenbeschichtete Filter ermittelten Werte werden in Abbildung 5.26 dargestellt. Das Hochsetzen erfolgte an Tag 8 nach dem Aussäen. Ca. 3 Tage danach begann der TEER-Wert zu steigen, wobei der Kurvenverlauf umso steiler war, je mehr Zellen anfangs ausgesät wurden. Nach 22 Tagen war der Wert für den Ansatz mit 10.000 Zellen immer noch unzureichend hoch, d. h. im Bereich eines leeren Filtereinsatzes, während die anderen Kurven bereits wieder absanken.

Das Standardmodell wurde mit 200.000 Zellen je 1,13 cm² angesetzt, um ein möglichst günstiges Verhältnis von erzielter Barrierefunktion und benötigter Zellzahl zu erreichen.

5.5.2.4. Einfluss von Medienzusätzen und Beschichtungen

Außer der signifikanten Abhängigkeit des TEER-Wertes vom Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze ($p < 0,05$) war keine weitere signifikante Abhängigkeit von Kultivierungsmethoden zu erkennen (Abbildung 5.27 – Abbildung 5.29).

Im Fall von einzelnen Medienzusätzen (Abbildung 5.27) entwickelten Kulturen mit 2 % FKS (Medien E-H, siehe Tabelle 13) tendenziell niedrigere TEER-Werte, jedoch aufgrund der hohen Schwankungen nicht signifikant. Das Grundmedium ohne weitere Zusätze (A) erreichte den höchsten Wert von durchschnittlich 75 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Bei Supplement-Kombinationen (Abbildung 5.28) war die Abhängigkeit vom Hochsetzen weniger deutlich. Auch der Serumgehalt hatte keinen eindeutigen Effekt. Bei Zusatz von CT und RA bzw. von CT, RA und DMSO hatte er keinen Einfluss, beim Zusatz von CT und DMSO bzw. RA und DMSO führte ein geringerer Serumgehalt zu höheren TEER-Werten.

Das Standardmodell wurde im Weiteren mit Grundmedium supplementiert mit 10 % FKS ohne weitere Zusätze kultiviert, weil so die höchsten TEER-Werte zu erwarten waren.

Tabelle 13: Medienzusammensetzungen für TEER-Untersuchungen an epithelialen Modellen (NEAA: Nichtessentielle Aminosäuren, FKS: Fetales Kälberserum, CT: Cholera toxin, RA: Retinolsäure, DMSO: Dimethylsulfoxid).

Grundmedium	Zusätze
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>10 % FKS</u>	A Keine
	B + CT 10 ng/ml
	C + RA 10 ng/ml
	D + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>2 % FKS</u>	E Keine
	F + CT 10 ng/ml
	G + RA 10 ng/ml
	H + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>10 % FKS</u>	I + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml
	J + CT 10 ng/ml + DMSO 5 %
	K + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
	L + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
MEM Earle + 1 % L-Glutamin + 1 % NEAA + <u>2 % FKS</u>	M + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml
	N + CT 10 ng/ml + DMSO 5 %
	O + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %
	P + CT 10 ng/ml + RA 10 ng/ml + DMSO 5 %

Aufgrund der Ergebnisse aus Wachstumsuntersuchungen an RPMI 2650 wurde auch eine Kollagenbeschichtung untersucht. Die hier erreichten TEER-Werte waren deutlich schlechter als die ohne Beschichtung (Abbildung 5.29). Auch hier könnte das Problem darin liegen, dass die Kollagenbeschichtung sich bei häufigem Mediumwechsel teilweise ablöste.

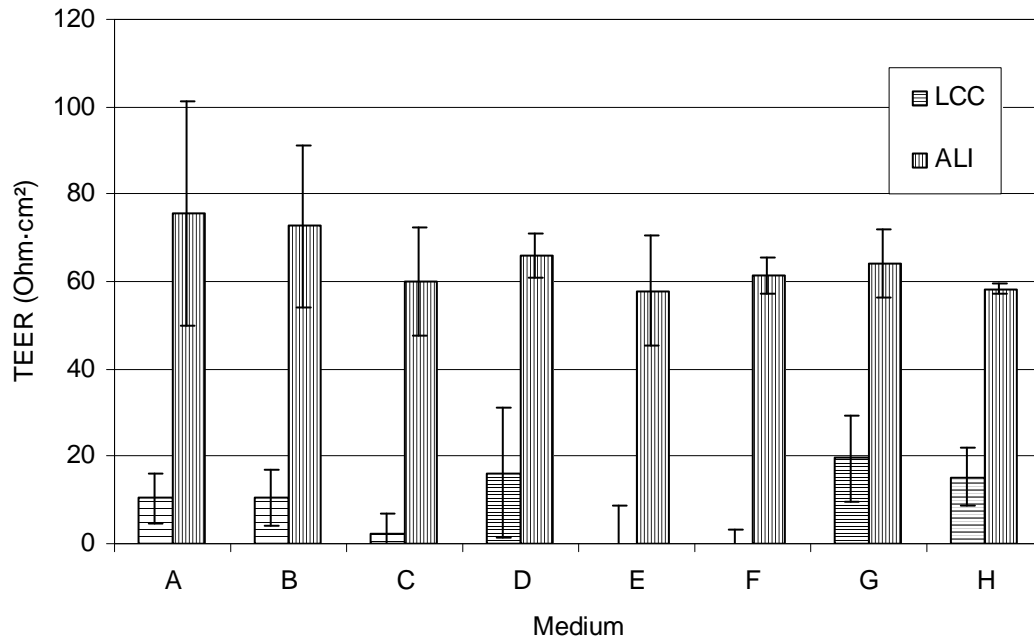


Abbildung 5.27 TEER von RPMI 2650 (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) auf Transwell-Filtereinsätzen an Tag 23 nach Aussaat in Abhängigkeit vom Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze (ALI) an Tag 8 und von verschiedenen Medienzusätzen (siehe Tabelle 13) (LCC: submerse Kultur), MW \pm SD, n=3.

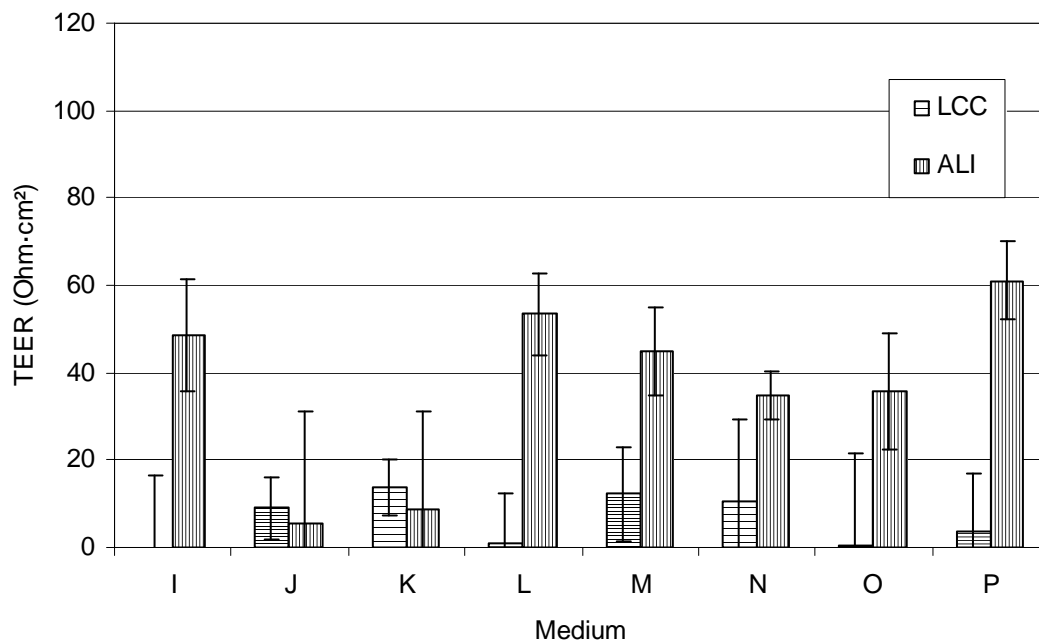


Abbildung 5.28 TEER von RPMI 2650 (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) auf Transwell-Filtereinsätzen an Tag 23 nach Aussaat in Abhängigkeit vom Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze (ALI) an Tag 8 und von verschiedenen Medienzusätzen (siehe Tabelle 13) (LCC: submerse Kultur), MW \pm SD, n=3.

5.5.2.5. Einfluss von HNF-Kokultur

In Abbildung 5.29 ist der TEER-Wert von epithelialen Modellen dargestellt. Eindeutig ist auch hier der entscheidende Einfluss der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze (ALI) erkennbar. Daneben wurde der Einfluss einer kontaktlosen HNF-Kokultur untersucht. Diese Kokultur von 20.000 HNF und 200.000 RPMI 2650 erbrachte keine Verbesserung des TEER-Wertes. Im Falle von mit 10 % FKS kultivierten Modellen mit ALI verringerte sich der TEER-Wert eher, jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Modell mit 2 % FKS sowie in den submers kultivierten Modellen war kein Einfluss der HNF-Kokultur zu erkennen.

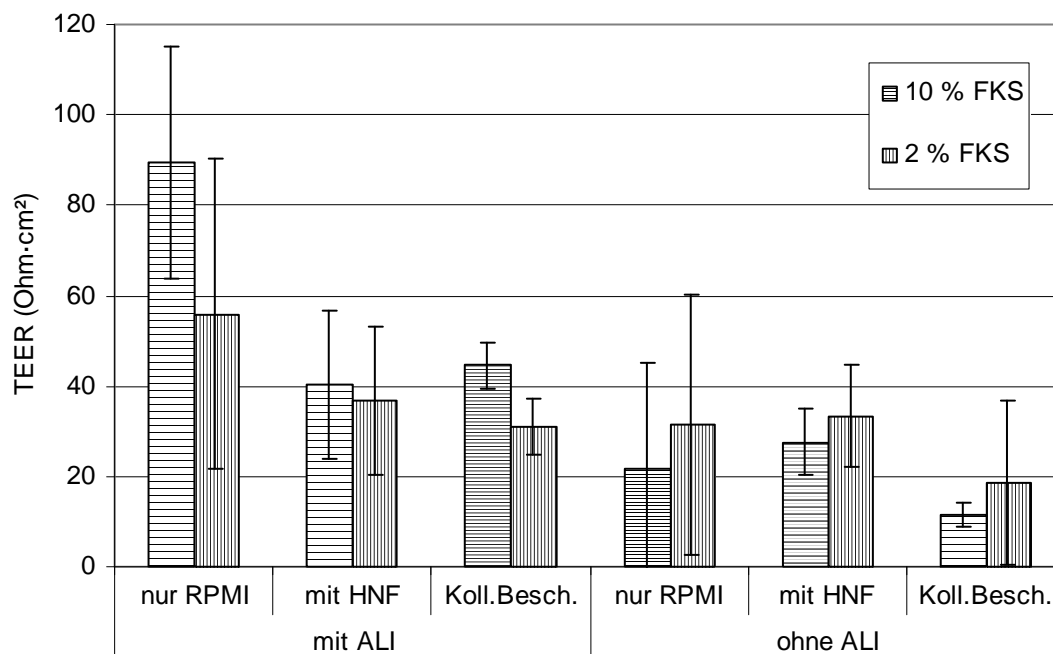


Abbildung 5.29 TEER von RPMI 2650 (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) auf Transwell-Filtereinsätzen an Tag 21 nach Aussaat in Abhängigkeit vom Serumgehalt (FKS) des Mediums, HNF-Kokultur und Kollagenbeschichtung der Filteroberfläche, MW \pm SD, n=3.

HNF-Kokulturen wurden dennoch weiterhin mit untersucht, um einen eventuellen Einfluss der HNF auf andere Funktionen, wie Permeabilität oder Transporterexpression, erkennen zu können.

5.5.3. Dreidimensionale Modelle

5.5.3.1. Verlauf über die Zeit

Konstrukte mit einem direkten Kontakt von HNF und Epithelzellen wurden 3 bzw. 4 Wochen nach Aussaat der HNF untersucht (siehe 4.2.3.4). Bezüglich des TEER-

Wertes war zwischen den beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 5.30). Ein auffälliger Wert bei 100.000 HNF und 100.000 RPMI 2650 nach 3 Wochen Kultivierungsdauer war auf einen einzelnen abweichenden Messwert zurückzuführen und nicht mit der Kultivierungsdauer zu begründen.

Um die Kultivierung möglichst stark an die der epithelialen Modelle anzulehnen, wurde standardmäßig eine Dauer von 4 Wochen gewählt. So wurden die Epithelzellen wie im reinen Epithelmodell eine Woche submers und zwei Wochen an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, um ausreichend Zeit zum Ausbilden eines geschlossenen Multilayers zu haben.

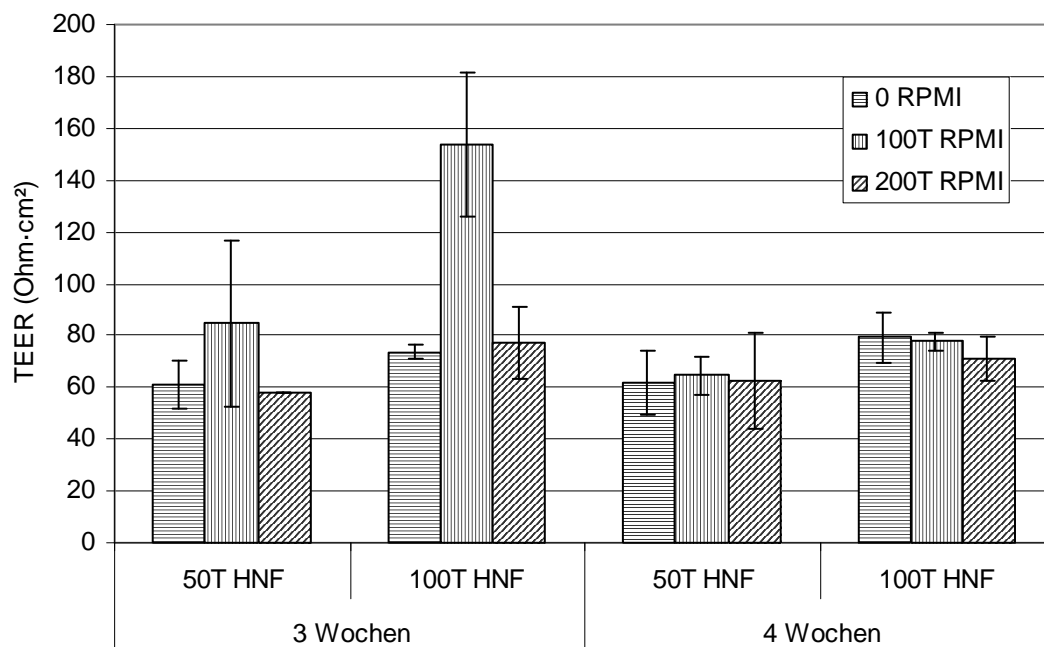


Abbildung 5.30 TEER (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) von dreidimensionalen Konstrukten 3 bzw. 4 Wochen nach Einsaat der HNF in die Kollagengele. Gezeigt wird die Abhängigkeit von Fibroblasten- und Epithelzellzahlen (T: Tausend). MW \pm SD, n=2.

5.5.3.2. Einfluss von Zellzahlen

Mit steigender HNF-Zahl stieg tendenziell auch der TEER-Wert (Abbildung 5.31). Dies erklärt sich dadurch, dass durch die stärkere Kontraktion und den resultierenden sinkenden Durchmesser die Dicke der Konstrukte zunahm. Außerdem war mit steigender Epithelzellzahl eine Tendenz zu höheren TEER-Werten zu erkennen. Aufgrund relativ großer Standardabweichungen waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant.

Die Werte variierten zwischen $54 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (0 HNF, 0 RPMI 2650, reine Kollagenmatrix) und $98 \Omega\cdot\text{cm}^2$ (100.000 HNF, 400.000 RPMI 2650). Mit dem Standardmodell (50.000 HNF, 200.000 RPMI 2650) wurden Werte von ca. $63 \Omega\cdot\text{cm}^2$ erreicht. Modelle mit höheren Zellzahlen erreichten zwar höhere TEER-Werte, waren aber schwieriger zu handhaben. Hohe HNF-Zahlen führten wie beschrieben zu einer starken Kontraktion des Gels und damit zu einer kleineren Fläche, die für die Aussaat der Epithelzellen zur Verfügung steht. Beim Aufbringen der Zellsuspension könnte daher sehr leicht Flüssigkeit über die Ränder des Konstrukts hinauslaufen, und Epithelzellen können an die Unterseite der Kollagenmatrix gelangen. Konstrukte mit 100.000 HNF im Gel wurden daher nur für einzelne Permeationen verwendet und deren Ergebnisse kritisch bewertet.

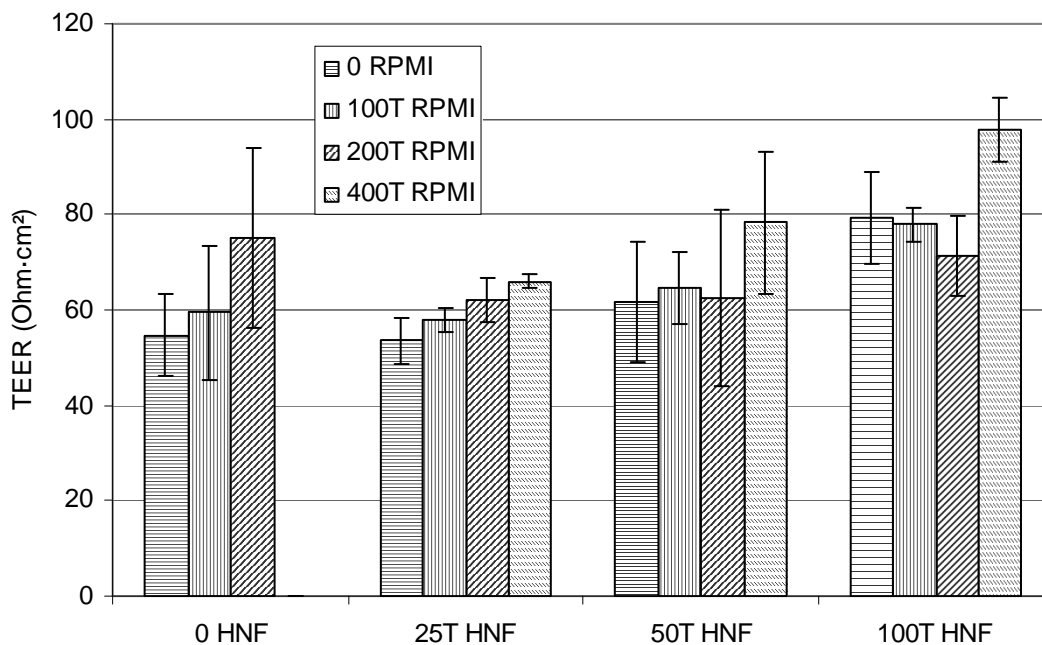


Abbildung 5.31 TEER (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) von dreidimensionalen Konstrukten 4 Wochen nach Einsaat der HNF in die Kollagengele. Gezeigt wird die Abhängigkeit von Fibroblasten- und Epithelzellzahlen (T: Tausend). MW \pm SD, n=2.

5.5.4. Zusammenfassende Diskussion zu TEER-Messungen an den Modellen

In dieser Arbeit wurden für exzidiertes humanes Gewebe TEER-Werte von durchschnittlich $128 \pm 35 \Omega\cdot\text{cm}^2$ gemessen, das Standard-Epithelmodell erreichte $75 \Omega\cdot\text{cm}^2$, das dreidimensionale Standardmodell $63 \Omega\cdot\text{cm}^2$.

Exzidierte Kaninchenmukosa wird mit einem TEER-Wert von ca. $40 \Omega\cdot\text{cm}^2$ beschrieben (Kubo et al., 1994), exzidierte bovine Mukosa ebenfalls (Schmidt et al.,

2000). Wadell et al. verwendeten porcine Mukosa und maßen TEER-Werte von durchschnittlich $52\text{-}74\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, abhängig vom Herkunftsort der Gewebeprobe. Sie legten einen Mindestwert von $25\text{-}40\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ für die Verwendbarkeit der Proben fest (Wadell et al., 1999).

In einer Studie zur Permeation von mucoadhäsiven Microsphären, die an RPMI 2650 getestet wurden, wurden TEER-Werte von ca. $150\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ für die intakten Monolayer erreicht (Harikarnpakdee et al., 2006). Durch Zusatz der Microsphären wurde der TEER jedoch rapide abgesenkt, was die Autoren auf einen reversiblen Einfluss auf Tight Junctions und Actinringe zurückführen.

In einer jüngeren Studie mit RPMI 2650 wurden ebenfalls höhere TEER-Werte durch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze erreicht (Bai et al., 2008). Abhängig von der Art der Filtereinsätze und ihrer Beschichtung erreichte man ca. 140 bis $190\ \Omega\cdot\text{cm}^2$. Die Autoren wiesen mittels Western Blot und immunhistochemischer Färbung auch die Expression von Tight Junction-Proteinen unter diesen Bedingungen nach.

Agu et al. fanden an ihren Modellen mit HNE an der Luft-Medium-Grenze TEER-Werte von $200\text{-}650\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ bei Kultivierung auf Kollagenmembranen und bis zu $1349 \pm 508\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ auf Kollagengelen (Agu et al., 2001). Diese sehr hohen Werte werden durch andere Berichte von HNE in Primärkultur bestätigt. So beschreiben z. B. Lee et al. für HNE in submerser Kultur einen maximalen TEER von $1963\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, an der Luft-Medium-Grenze $3453\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ (Lee et al., 2005). Hier wird zum einen der große Einfluss des Luftkontaktes auch auf HNE deutlich, zum anderen die immens höheren Werte gegenüber exzidierte Mukosa. Auch Yoo et al. finden abhängig von der Passagezahl der HNE sehr hohe TEER-Werte von durchschnittlich $3133\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ (Passage 2) bis $693\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ (Passage 5) (Yoo et al., 2003).

Tabelle 14: TEER-Werte der verschiedenen Modelle im Vergleich mit Literaturdaten von HNE-Modellen.

Exzidierte humane Mukosa	Epitheliales Modell	Dreidimensionales Modell	HNE (Literatur)
$128 \pm 35\ \Omega\cdot\text{cm}^2$	$75 \pm 23\ \Omega\cdot\text{cm}^2$	$63 \pm 19\ \Omega\cdot\text{cm}^2$	$200\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ (Agu et al., 2001) bis $3453\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ (Lee et al., 2005)

Vergleicht man die Werte der verschiedenen Modelle (siehe Tabelle 14), so fällt die große Differenz zwischen exzidierte Mukosa und HNE-Modellen auf. HNE-Modelle erreichen konsequent wesentlich höhere TEER-Werte als die exzidierte Mukosa. Wie unter 2.4.1.3 bereits beschrieben, ist eine mögliche Erklärung die selektive Isolierung und Kultivierung von Tight Junction-bildenden, zilienträgenden Zellen. Dagegen werden Becherzellen benachteiligt, weil ihr Anheftungsvermögen geringer als das der zilienträgenden Zellen ist. Diese Becherzellen sind aber im Schleimhautepithel für sogenannte „Fehlstellen“ in den Tight Junctions und damit für eine geringere Barrierefunktion des Epithels verantwortlich (Carson et al., 1987; Dahl und Mygind, 1998; Grubb et al., 2006; Inagaki et al., 1985). Dies führt zu einer sehr viel dichteren Barriere bei der Kultivierung von HNE, als man in vivo in der Nasenschleimhaut vorfindet. Denkbar ist auch, dass die isolierten Primärzellen zwar das gleiche Verhältnis der Zelltypen wie in der Mukosa aufweisen, aber unter den In-vitro-Bedingungen eine dichtere Barriere ausbilden können. Beispielsweise könnte hier die unphysiologische Wachstumsfläche oder die fehlende mechanische Belastung des Epithels, z B. durch den Luftstrom, eine Rolle spielen. Im Blick auf den TEER-Wert der Barriere scheinen HNE kein optimales Modell der nasalen Mukosa zu sein.

Hier bietet das RPMI 2650-Epithelmodell eine bessere Möglichkeit. Es weist zwar keine Becherzellen und zilienträgenden Zellen auf, ist aber in Bezug auf den transepithelialen elektrischen Widerstand den physiologischen Eigenschaften der Nasenschleimhaut wesentlich näher. Mit dem dreidimensionalen Modell lassen sich ähnliche Werte erreichen, insbesondere bei hohen Zellzahlen. Diese Modelle mit TEER-Werten bis zu $97 \Omega \cdot \text{cm}^2$ müssen aber wegen einer möglichen zweiten Epithelschicht auf der Unterseite kritisch betrachtet werden (s. o.). Aber auch das Standardmodell mit 50.000 HNF und 200.000 RPMI 2650 führt zu guten Ergebnissen. Inwieweit diese vielversprechenden Ergebnisse sich durch Permeationsuntersuchungen bestätigen lassen, sollte im nächsten Schritt geklärt werden.

5.6. Permeationsuntersuchungen

In dieser Arbeit sollten geeignete Modelle entwickelt werden, um die Permeation von Modellstoffen durch humane nasale Mukosa testen zu können. Ein einfaches, reproduzierbares Modell ist hier sinnvoll, da In-vivo-Tests bei Tieren aufwändig und nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragbar sind. Zudem sollte generell die Anzahl an Tierversuchen eingeschränkt werden. Die Arbeit mit humanem exzidierten Gewebe führt zwar zu wertvollen Ergebnissen, wird aber durch die geringe Verfügbarkeit bei gleichzeitig geringer Probenmenge des Spendenmaterials erschwert. Die interindividuellen Schwankungen der Gewebeeigenschaften lassen zudem oft keinen direkten Vergleich mehrerer Versuchsreihen zu.

Um nun die Eignung der hier entwickelten Modelle, des epithelialen Modells und des dreidimensionalen Modells, für einen solchen Einsatz zu testen, ist es sinnvoll, zunächst die passive Permeation ausgewählter Markersubstanzen zu untersuchen. Die Hauptwege der passiven Permeation sind der parazelluläre und der transzelluläre Weg. Ersterer ist hauptsächlich für hydrophile Stoffe mit geringem Molekulargewicht von Bedeutung, letzterer für lipophile Stoffe. Hierfür wurde jeweils ein Modellstoff gewählt: Natrium-Fluorescein als Marker für die parazelluläre Permeation, Propranolol-HCl als Marker für den transzellulären Weg. Die nasale Applikation ist auch ein vielversprechender Weg für den Einsatz großer Peptidmoleküle mit systemischer Wirkung wie z. B. Calcitonin (MW 3421) oder Insulin (MW ca. 5800, für die nasale Applikation nicht auf dem Markt). Daher ist es entscheidend für ein In-vitro-Modell, auch für diese Stoffe eine organotypische Permeationsbarriere darzustellen. Als zusätzlicher Modellstoff wurde daher FITC-markiertes Dextran mit einem Molekulargewicht von 4000 (FD4) gewählt, das parazellulär permeiert.

5.6.1. Parazelluläre Permeation – Natrium-Fluorescein

5.6.1.1. Exzidiertes humanes Gewebe

Für exzidiertes humanes Gewebe wurden mit der beschriebenen Methode in Ussing-Kammern für Natrium-Fluorescein Permeationskoeffizienten von $8,2 \cdot 10^{-7}$ cm/s bis zu $5,5 \cdot 10^{-5}$ cm/s gemessen, wobei der Mittelwert bei $3,12 \pm 1,99 \cdot 10^{-6}$ cm/s lag (n=4). Hierbei waren zum Teil Lag-Phasen von bis zu einer Stunde zu beobachten.

5.6.1.2. Epitheliale Modelle

Einfluss von Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze

Wie in den folgenden Diagrammen bzw. Tabellen deutlich zu erkennen ist, war die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze von entscheidender Bedeutung für die Ausbildung einer adäquaten Permeationsbarriere. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der TEER-Messungen und mikroskopischen Untersuchungen. Submers kultivierte Modelle lieferten hingegen Permeationskoeffizienten, die auch für leere Filter beobachtet wurden (Abbildung 5.32) und signifikant höher waren als die der Kulturen an der Luft-Medium-Grenze ($p < 0,05$).

Einfluss von Medienzusätzen und Beschichtungen

Der Einfluss vom Serumgehalt des Mediums (10 bzw. 2 % FKS) und der Einfluss einer Kollagenbeschichtung der Wachstumsoberfläche wurden untersucht. Der niedrigste Permeationskoeffizient wurde mit $6,09 \pm 1,38 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ bei der Kultivierung mit 10 % FKS, ohne Kollagenbeschichtung und mit Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze erreicht (Abbildung 5.32). Dieser Wert ist ca. doppelt so hoch wie der für exzidierte Mukosa ermittelte. Dieses Modell entspricht also bei der parazellulären passiven Permeation in etwa der humanen Mukosa.

Mit 2 % FKS wird ein Wert von $9,38 \pm 0,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ erreicht, submerser Kulturen erreichen $349 \text{ bzw. } 227 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$, ähnlich wie der blanke Filter ($186 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$).

Mit Kollagenbeschichtung zeigten sich für 2 % FKS jeweils leicht höhere Werte als für 10 % FKS, der Unterschied zwischen submerser und ALI-Kultur war hier jedoch viel kleiner und nicht signifikant. Mikroskopisch war mit ALI ein gleichartig ausgebildeter konfluenter Multilayer wie ohne Kollagenbeschichtung zu erkennen, bei submerser Kultur jedoch nicht. Dennoch waren die Permeationskoeffizienten in submerser Kultur mit Kollagenbeschichtung (mit 10 % FKS signifikant, $p < 0,05$) niedriger als ohne Kollagenbeschichtung. Zu vermuten ist, dass die Kollagenbeschichtung selbst den Filtereinsatz teilweise verschließt und somit zur Barriere beiträgt. Die Epithelzellen hätten dann hier einen deutlich geringeren Einfluss.

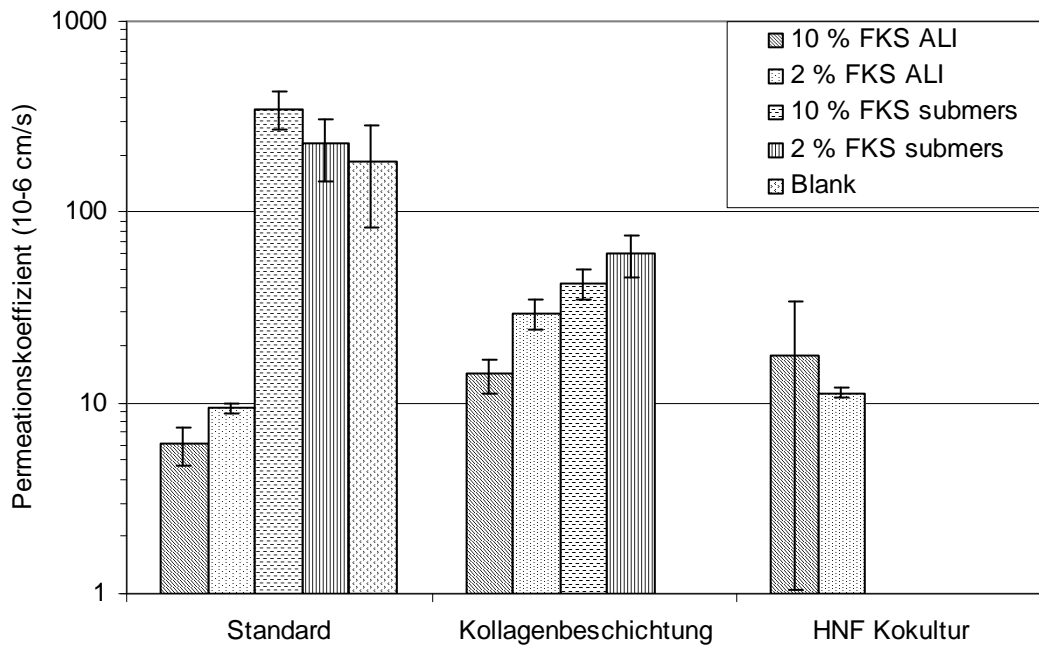


Abbildung 5.32 Permeationskoeffizienten (in 1×10^{-6} cm/s) von Natrium-Fluorescein durch epitheliale Modelle 3 Wochen nach Aussaat von 200.000 RPMI 2650 gegenüber leerem Filter (Blank). ALI-Kulturen wurden an Tag 8 hochgesetzt. MW \pm SD, $n \geq 3$.

Einfluss von HNF-Kokultur

Bei der HNF-Kokultur wurden zwei Tage vor der Aussaat der Epithelzellen HNF auf den Boden des Wells ausgesät. Die erreichten Werte mit ALI waren leicht erhöht gegenüber dem Standardmodell, jedoch deutlich niedriger als in submerser Kultur (Abbildung 5.32). Eine Kokultur bringt somit für die parazelluläre Permeationsbarriere keine Verbesserung.

Einfluss der Kultivierungsdauer

2 bzw. 3 Wochen nach Aussaat wurden die Permeationsuntersuchungen an den Modellen durchgeführt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Permeationskoeffizienten nach 2 Wochen signifikant höher als nach 3 Wochen ausfielen ($p < 0,01$) (Abbildung 5.33). Mit 10 % FKS sank der Wert von $10,97 \pm 0,52 \cdot 10^{-6}$ cm/s nach 2 Wochen auf $6,09 \pm 1,38 \cdot 10^{-6}$ cm/s nach 3 Wochen. Mit 2 % FKS war der Abfall noch stärker, von $75,15 \pm 15,49 \cdot 10^{-6}$ cm/s auf $9,38 \pm 0,6 \cdot 10^{-6}$ cm/s.

Mikroskopisch war ebenfalls zu erkennen, dass nach 2 Wochen die Epithelzellschicht noch Lücken aufwies, während sie nach 3 Wochen weitgehend konfluent gewachsen

war. Hier bestätigte sich die Beobachtung der Entwicklung des TEER-Wertes über die Zeit. Dieser begann ca. 3 Tage nach Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze zu steigen und erreichte sein Maximum ca. 14 Tage nach Hochsetzen (Abbildung 5.26). Die Modelle wurden deswegen standardmäßig 3 Wochen kultiviert, davon 2 Wochen an der Luft-Medium-Grenze.

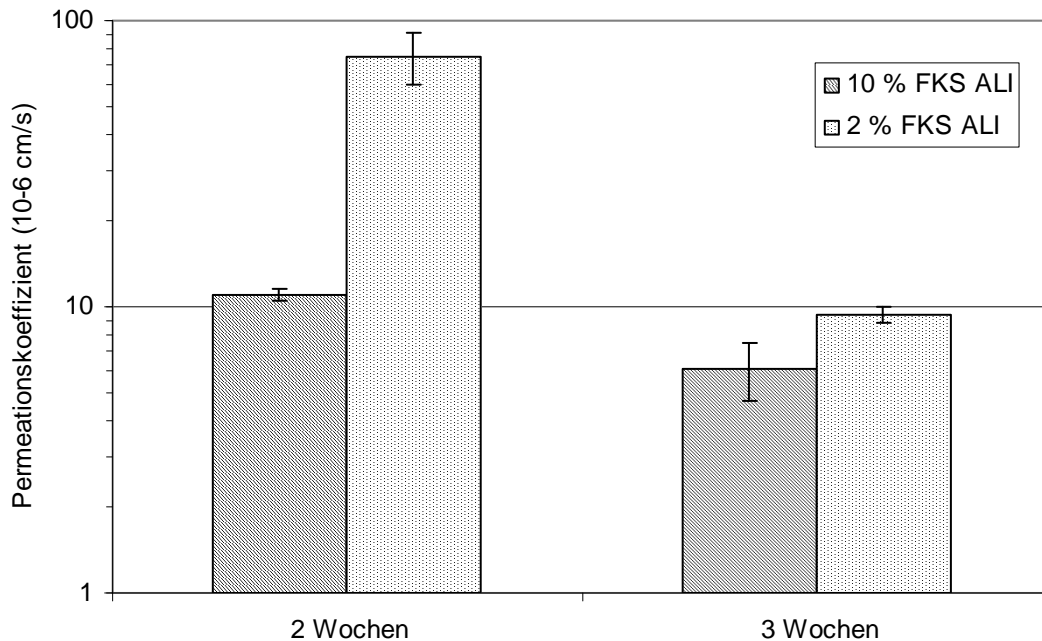


Abbildung 5.33 Permeationskoeffizienten (in 1×10^{-6} cm/s) von Natrium-Fluorescein durch epitheliale Modelle 2 bzw. 3 Wochen nach Aussaat von 200.000 RPMI 2650, ohne HNF und Kollagenbeschichtung, MW \pm SD, n \geq 3.

5.6.1.3. Dreidimensionale Modelle

Einfluss von Zellzahlen

Das Standardmodell mit 50.000 HNF und 200.000 RPMI 2650 wies mit der beschriebenen Methode zur Permeation in Ussing-Kammern (siehe 4.2.3.5) für Natrium-Fluorescein einen Permeationskoeffizienten von $20,6 \pm 6,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s auf (Abbildung 5.34). Dieser Wert lag deutlich höher als der durchschnittliche Wert für exzidiertes Gewebe, jedoch noch innerhalb der Spannweite der Permeationskoeffizienten durch exzidiertes Gewebe. Er ist ca. um den Faktor 3 höher als der Permeationskoeffizient durch das reine Epithelmodell ($6,09 \cdot 10^{-6}$ cm/s, siehe Abbildung 5.32).

Konstrukte ohne Fibroblasten zeichneten sich durch hohe Schwankungen aus. Diese Konstrukte waren mechanisch sehr instabil. Ein reines Kollagengel ohne Zellen zeigte einen Permeationskoeffizienten von $58 \pm 26,9 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Bei 25.000, 50.000

und 100.000 HNF im Gel war ohne Epithelzellen kein Unterschied zu erkennen. Mit Epithelzellen wurden die Permeationskoeffizienten sowohl mit steigender HNF-Zahl als auch mit steigender RPMI 2650-Zahl kleiner. Ein minimaler Permeationskoeffizient von $9,29 \pm 2,64 \cdot 10^{-6}$ cm/s wurde mit 100.000 HNF und 400.000 RPMI 2650 erreicht. Die Abstufungen der Permeationskoeffizienten korrelierten gut mit den Ergebnissen der TEER-Messungen. Hohe TEER-Werte bedeuten eine relativ dichte Barriere für parazellulär permeierende Stoffe. Auch der Geldurchmesser hängt indirekt mit den Barriereigenschaften zusammen, da ein kleiner Durchmesser bei diesem Aufbau eine größere Schichtdicke des Konstruktes und damit einen längeren Permeationsweg bedeutet.

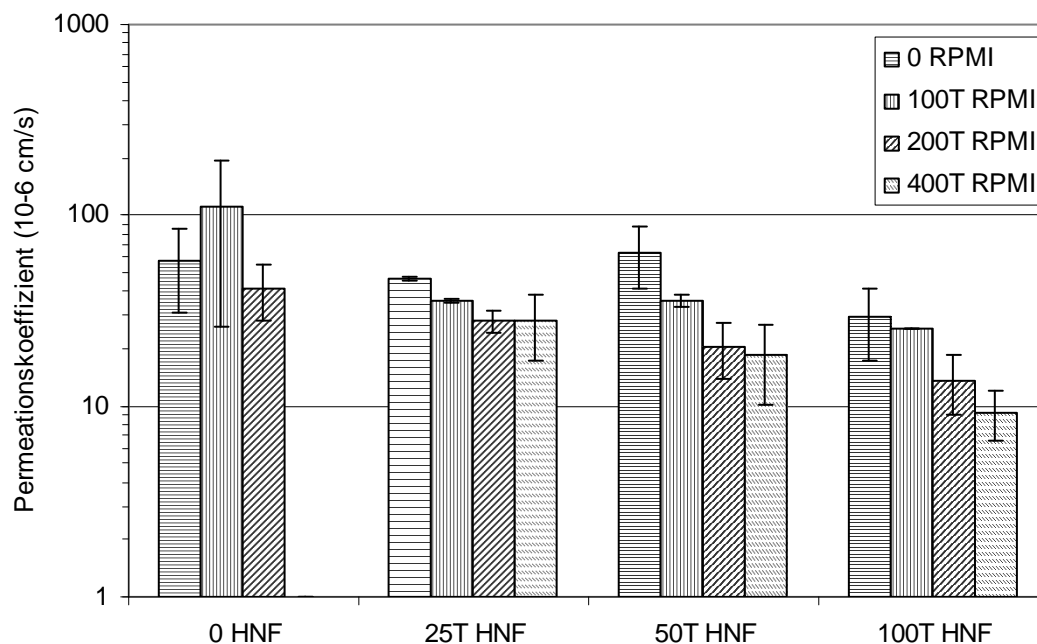


Abbildung 5.34 Permeationskoeffizienten (in 1×10^{-6} cm/s) von Natrium-Fluorescein durch dreidimensionale Modelle, 4 Wochen nach HNF-Einsaat und 3 Wochen nach RPMI 2650-Aufsaat, in Abhängigkeit von Fibroblasten- und Epithelzellzahl (T: Tausend). MW \pm SD, n \geq 3.

Modelle mit höheren Zellzahlen erreichten zwar niedrigere Permeationskoeffizienten, waren aber schwieriger zu handhaben. Hohe HNF-Zahlen führten wie beschrieben zu einer starken Kontraktion des Gels und damit zu einer kleineren Fläche, die für die Aussaat der Epithelzellen zur Verfügung steht. Beim Aufbringen der Zellsuspension könnte daher sehr leicht Flüssigkeit über die Ränder des Konstrukts hinauslaufen, und Epithelzellen können an die Unterseite der Kollagenmatrix gelangen. Zudem ließen sich Konstrukte mit sehr kleinem Durchmesser deutlich schwieriger in Permeationskammern einspannen.

Einfluss der Kultivierungsdauer

Nach 2 bzw. 3 Wochen Kultivierungsdauer nach Aufsaat der RPMI 2650 (3 bzw. 4 Wochen nach Einbetten der HNF) unterschieden sich die Mittelwerte der Permeationskoeffizienten kaum voneinander (Abbildung 5.35). Die einzelnen Messwerte wichen jedoch bei den kürzer kultivierten Konstrukten stärker voneinander ab. Diese Ergebnisse ergänzen die beschriebenen TEER-Werte, die sich ebenfalls im Mittelwert nach 3 bzw. 4 Wochen nicht unterschieden, aber nach 3 Wochen noch größere Schwankungen aufwiesen. Daher wurden die Konstrukte, wie unter 5.5.3 beschrieben, im Folgenden standardmäßig nach der Aufsaat der Epithelzellen 3 Wochen weiter kultiviert, davon die beiden letzten Wochen an der Luft-Medium-Grenze.

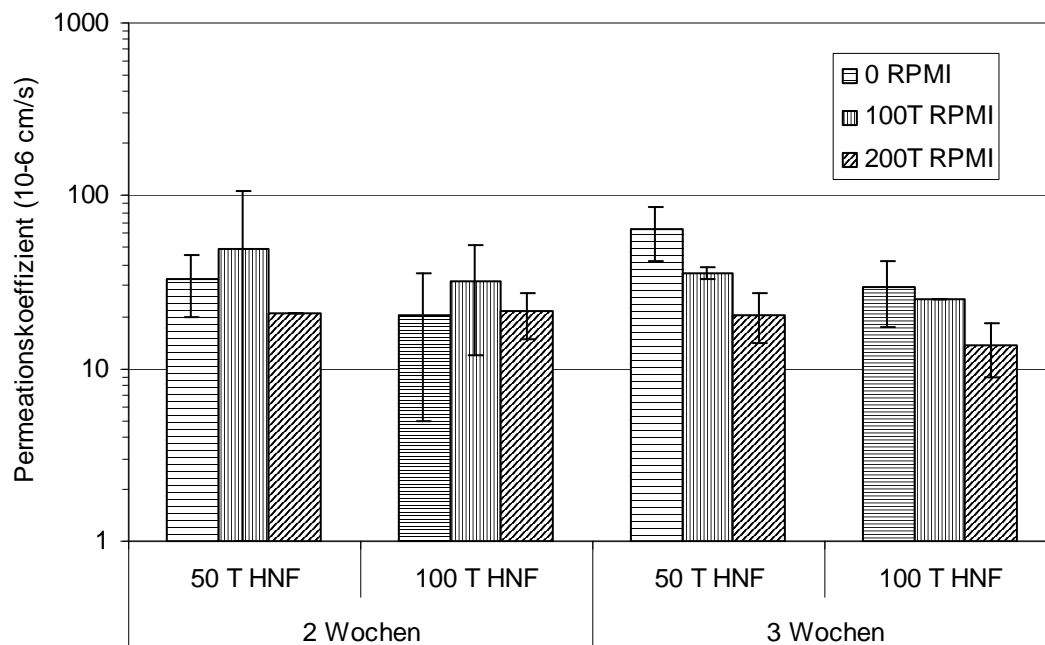


Abbildung 5.35 Permeationskoeffizienten (in 1×10^{-6} cm/s) von Natrium-Fluorescein durch dreidimensionale Modelle mit 50.000 bzw. 100.000 HNF je Konstrukt, 2 bzw. 3 Wochen nach RPMI 2650-Aufsaat (T: Tausend), MW \pm SD, $n \geq 2$ (50T HNF, 200T RPMI, 2 Wochen und 100T HNF, 100T RPMI 3 Wochen: $n=1$).

5.6.2. Transzelluläre Permeation – Propranolol-HCl

5.6.2.1. Epitheliale Modelle

Einfluss der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze

Der Unterschied der Permeationskoeffizienten zwischen submerser und Kultur an der Luft-Medium-Grenze war bei transzellulärer Permeation weniger ausgeprägt als bei parazellulärer. Dennoch waren die Permeationskoeffizienten bei submerser Kultur signifikant höher, im Standardmodell mit 10 % FKS ca. um den Faktor 3 ($p < 0,05$) (Abbildung 5.36). Hier wurde mit ALI ein Wert von $3,1 \pm 0,12 \cdot 10^{-5}$ cm/s erreicht. Im Modell mit 2 % FKS war der Unterschied geringer und nicht mehr signifikant.

Der im Standardmodell erreichte Permeationskoeffizient war gegenüber dem für exzidiertes Gewebe beschriebenen ($2,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Wadell et al., 2003)) leicht erhöht, aber in derselben Größenordnung.

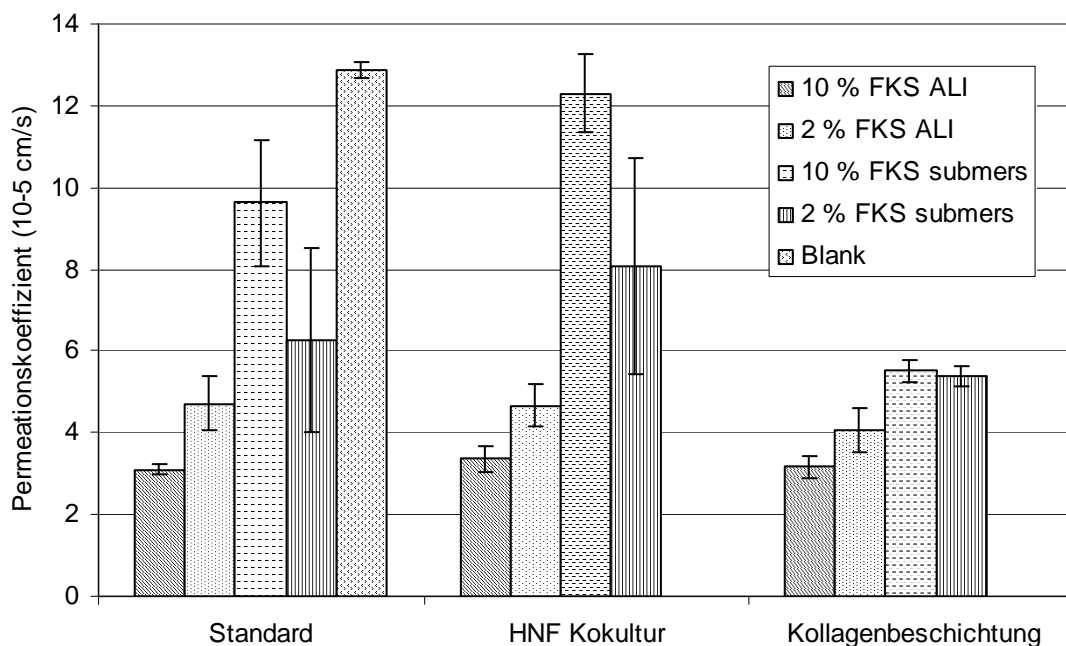


Abbildung 5.36 Permeationskoeffizienten von Propranolol-HCl (in 10^{-5} cm/s) durch epitheliale Modelle 3 Wochen nach Aussaat von 200.000 RPMI 2650 gegenüber leerem Filter (Blank). ALI-Kulturen wurden an Tag 8 hochgesetzt. MW \pm SD, n=3.

Einfluss von Serumgehalt und Beschichtungen

Der Einfluss vom Serumgehalt des Mediums (10 bzw. 2 % FKS) und der Einfluss einer Kollagenbeschichtung der Wachstumsoberfläche wurden untersucht. Bei Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze in Gegenwart von 2 % FKS erwiesen sich

die epithelialen Modelle als durchlässiger im Vergleich zu einer Kultivierung mit 10 % FKS ($p < 0,05$) (Abbildung 5.36). In submersen Kulturen war dies umgekehrt, jedoch waren hier die Schwankungen auch sehr viel größer und die Werte zum Teil im Bereich des blanken Filters, so dass diese Modelle als Permeationsmodell nicht geeignet sind.

Die Kollagenbeschichtung führte bei Kulturen an der Luft-Medium-Grenze zu keiner Veränderung, submerse Kulturen zeigten hier kleinere Permeationskoeffizienten als ohne Beschichtung. Dieser Unterschied war bei Kultivierungen mit 10 % FKS signifikant ($p > 0,05$). Zu vermuten ist wie bei der parazellulären Permeation, dass die Kollagenbeschichtung selbst den Filtereinsatz in gewissem Maße verschließt.

Einfluss von HNF-Kokultur

Die HNF-Kokultur führte auch im Fall der transzellulären Permeation in keiner Kultivierungsvariante zu einer signifikanten Änderung des Permeationskoeffizienten im Vergleich zur Standardkultivierung (Abbildung 5.36). In submerser Kultur wurde er leicht, aber nicht signifikant erhöht. Auch für die transzelluläre Permeation haben demnach HNF in kontaktloser Kokultur keinen Einfluss auf die Barriereigenschaften der Epithelzellen.

5.6.2.2. Dreidimensionale Modelle

Einfluss von Zellzahlen

Das Standardmodell mit 50.000 HNF und 200.000 RPMI 2650 wies für Propranolol-HCl einen Permeationskoeffizienten von $1,54 \pm 0,46 \cdot 10^{-5}$ cm/s auf (Abbildung 5.37). Dieser lag im Bereich des für humanes exzidiertes Gewebe ermittelten von ca. $2,0 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Wadell et al., 2003). Ein reines Kollagengel ohne Zellen zeigte einen Permeationskoeffizienten von $4,19 \pm 3,42 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Gele ohne HNF waren grundsätzlich mechanisch instabil und ließen sich nur schwer ohne Beschädigungen in die Ussing-Kammern einspannen. Gegenüber dem zellfreien Gel war das Konstrukt mit 50.000 HNF, aber ohne Epithelzellen, bereits deutlich stabiler, was in einem kleineren Permeationskoeffizienten und kleineren Schwankungen resultierte. Die Aufsaat von 200.000 RPMI 2650 wiederum senkte den Permeationskoeffizienten weiter.

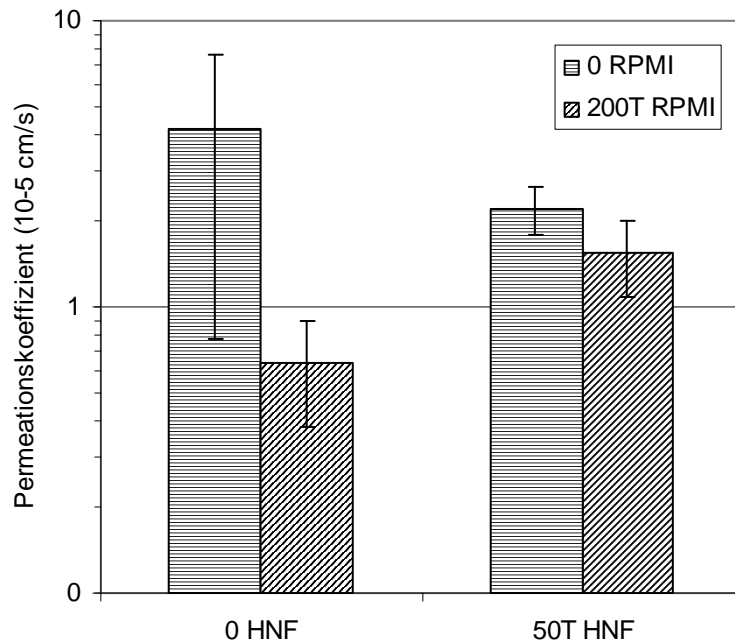


Abbildung 5.37 Permeationskoeffizienten von Propranolol-HCl (in 10⁻⁶ cm/s) durch dreidimensionale Modelle in Abhängigkeit von HNF- und Epithelzellzahlen (T: Tausend), 21 Tage nach Aussaat der RPMI 2650, MW ± SD, n=4.

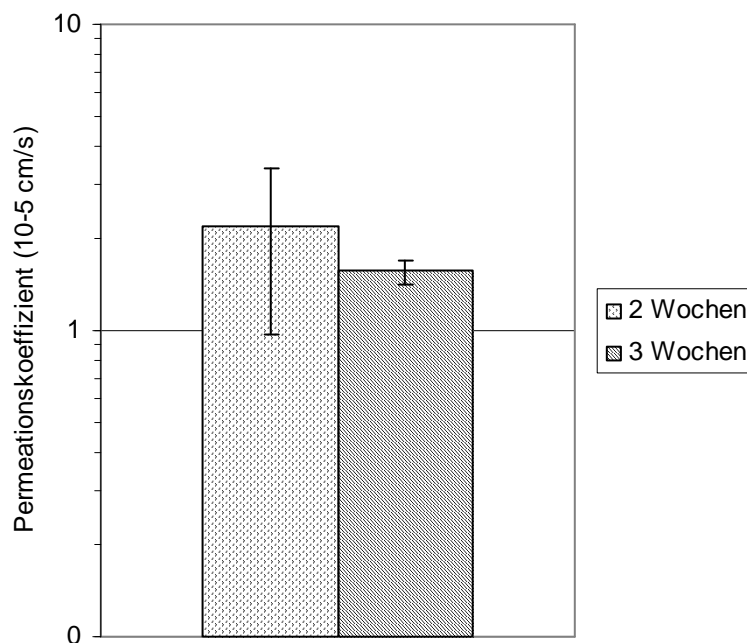


Abbildung 5.38 Permeationskoeffizienten von Propranolol-HCl (in 10⁻⁶ cm/s) durch dreidimensionale Modelle, 14 bzw. 21 Tage nach Aussaat der RPMI 2650 (25.000 HNF, 200.000 RPMI 2650), MW ± SD, n≥3.

Einfluss der Kultivierungsdauer

Eine Verlängerung der Kultivierungsdauer von 2 Wochen auf 3 Wochen nach Aussaat der Epithelzellen erbrachte im Durchschnitt keine Veränderung des Permeationskoeffizienten (Abbildung 5.38). Die Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen wurden jedoch deutlich kleiner. Möglich ist, dass die Epithelzellen zwar innerhalb von 2 Wochen einen dichten Multilayer bilden konnten, dieser aber erst nach 3 Wochen über die gesamte Fläche zuverlässig konfluent war.

5.6.3. Permeation von Makromolekülen – FITC-Dextran 4000

5.6.3.1. Epitheliale Modelle

Einfluss von Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze

Auch FITC-Dextran 4000 als ein parazellulär permeierender Stoff zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Permeationsgeschwindigkeit von der Kultivierung der Modelle (Abbildung 5.39). Submers kultivierte Epithelmodelle führten zu einem Permeationskoeffizienten, der ähnlich hoch wie der eines freien Filters war. An der Luft-Medium-Grenze kultivierte Modelle resultierten in einem signifikant niedrigeren Permeationskoeffizienten ($p < 0,01$). Wie bei Natrium-Fluorescein war die Permeationsgeschwindigkeit vor allem abhängig davon, ob die Zellen konfluent wuchsen bzw. wie viel Filterfläche unbewachsen blieb, und ob sie Tight Junctions ausbildeten. Wie beschrieben, erreichten submers kultivierte RPMI 2650-Zellen keine Konfluenz. Erst nach dem Hochsetzen an die Luft-Medium-Grenze begannen sie, die gesamte Filterfläche zuzuwachsen.

Einfluss von Medienzusätzen und Beschichtungen

Wie bei den anderen Markersubstanzen konnte auch hier mit dem Standardmodell die dichteste Barriere bzw. der niedrigste Permeationskoeffizient erreicht werden ($2,18 \pm 0,58 \cdot 10^{-6}$ cm/s) (Abbildung 5.39). Ein niedrigerer Serumgehalt bzw. zusätzliche Kollagenbeschichtung resultierten in höheren Werten. Kollagenbeschichtung führte allerdings für submers kultivierte Modelle zu einer signifikant ($p < 0,01$) verlangsamten Permeation gegenüber submersen Kulturen ohne Beschichtung. Dieses widersprüchliche Verhalten lässt sich dadurch erklären, dass die Beschichtung an sich schon die Porengröße und damit die für die Permeation zur Verfügung stehende Fläche des Filters verkleinern könnte. Dies würde für eine Verlangsamung gegenüber den nicht konfluenten Modellen sorgen. Andererseits sind mit Kollagen beschichtete Filter etwas empfindlicher als unbeschichtete, da sich die Beschichtung mitsamt den Zellen beim Mediumwechsel oder Spülen ablösen und damit zu einer Permeationsbeschleunigung gegenüber den konfluenten Modellen an der Luft-Medium-Grenze führen könnte.

Einfluss von HNF-Kokultur

Die HNF-Kokultur führte zu gleichen Permeationskoeffizienten wie die Standardkultivierung. Eine Verbesserung der Barriereigenschaften konnte auch hier nicht beobachtet werden.

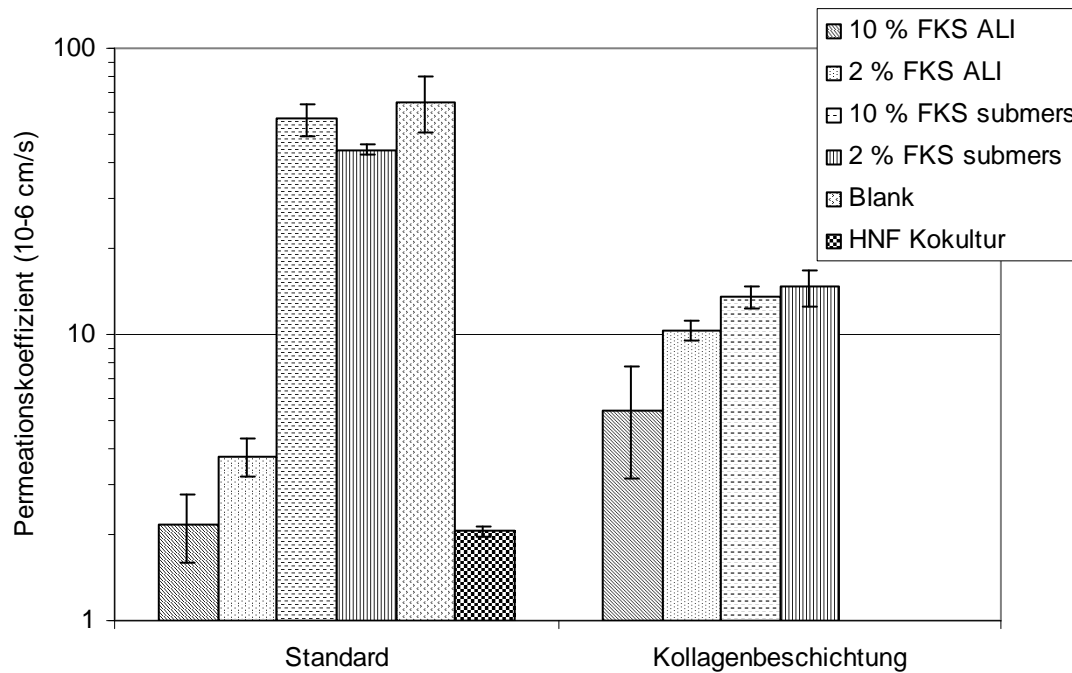


Abbildung 5.39 Permeationskoeffizient von FD4 (in 1×10^{-6} cm/s) durch epitheliale Modelle 3 Wochen nach Aussaat von 200.000 RPMI 2650 gegenüber leerem Filter (Blank). ALI-Kulturen wurden an Tag 8 hochgesetzt. MW \pm SD, n=3.

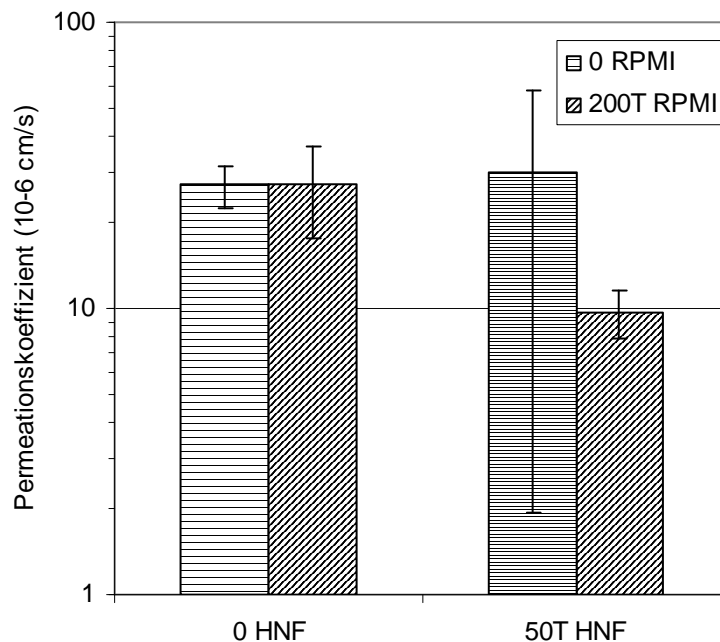


Abbildung 5.40 Permeationskoeffizient von FD4 (in 1×10^{-6} cm/s) durch dreidimensionale Modelle 3 Wochen nach Aufsaat der Epithelzellen in Abhängigkeit von HNF- und Epithelzellzahlen (T: Tausend), MW \pm SD, n=3.

5.6.3.2. Dreidimensionale Modelle

Das dreidimensionale Standardmodell mit 50.000 HNF und 200.000 RPMI 2650 zeigte einen ca. vierfach höheren Permeationskoeffizienten für FD4 als das Epithelmodell, nämlich $9,7 \pm 1,85 \cdot 10^{-6}$ cm/s (Abbildung 5.40). Ein Grund hierfür könnte die stärkere mechanische Belastung der Konstrukte beim Einspannen in die Permeationskammern sein. Modelle ohne Epithelzellen und auch Modelle ohne Fibroblasten, d.h. zellfreie Kollagengele, resultierten in nochmals ca. dreifach höheren Werten.

5.6.4. Zusammenfassende Diskussion zu Permeationsuntersuchungen an den Modellen

Die dreidimensionalen Modelle zeigten eine höhere Permeabilität als exzidiertes Gewebe und epitheliale Modelle, wiesen also möglicherweise weniger dichte Zell-Zell-Verbindungen auf, was bei parazellulären Permeationsuntersuchungen beachtet werden muss. Auch wenn die Epithelzellschicht in beiden Modellen morphologisch die gleichen Eigenschaften aufwies und durch die zusätzliche Kollagengelschicht zudem eine weitere Permeationsbarriere bestand, wiesen die dreidimensionalen Modelle geringere Barriereigenschaften im Vergleich zu den epithelialen Modellen auf. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte die komplexere Handhabung der Konstrukte sein, die für die Experimente aus den Transwell-Einsätzen in die Ussing-Kammern überführt werden mussten. Zusätzlich kam es in den Ussing-Kammern zu leichten Schereffekten im Randbereich. Diese mechanische Beanspruchung könnte insbesondere bei den instabilen Konstrukten mit geringer HNF-Zahl zu Beschädigungen geführt haben. Eine Verbesserung könnte durch eine Verfestigung der Kollagenmatrix erreicht werden, z. B. durch Verwendung anderer Kollagentypen oder von verfestigenden Zusätzen. Eine andere Möglichkeit könnte die Kultivierung in einem Medium sein, in dem die Kontraktion der Gele unterbunden wird. Diese Konstrukte könnten direkt im Filtereinsatz untersucht werden. Ob eine solche Kultivierung die sonstigen Eigenschaften der Konstrukte (negativ) beeinflusst, ist noch zu klären.

In dieser Arbeit wurden für den parazellulären Marker Natrium-Fluorescein Permeationskoeffizienten von $3,12 \pm 1,99 \cdot 10^{-6}$ cm/s für exzidierte humane nasale Mukosa, $6,09 \pm 1,38 \cdot 10^{-6}$ cm/s für das epitheliale Standardmodell und $20,6 \pm 6,7 \cdot 10^{-6}$ cm/s für das dreidimensionale Standardmodell gefunden (siehe

Tabelle 15). Vergleicht man diese Werte mit Literaturdaten für andere Modelle der nasalen Mukosa, so findet man eine ähnliche Abstufung wie bei den TEER-Messungen. HNE-Modelle, wie sie Agu et al. beschrieben, führten beispielsweise zu Permeationskoeffizienten von $0,19 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Kollagenmembran) bzw. $0,045 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Kollagengel) (Agu et al., 2001). Im Vergleich zu dem in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Wert von $3,12 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ für exzidierte humane Mukosa ist das ein mehr als 10fach niedrigerer Wert. Gründe hierfür können, wie unter 5.5.4 beschrieben, eine selektive Isolierung von Tight Junction-bildenden Zellen oder das Ausbilden einer dichteren Barriere unter In-vitro-Bedingungen sein. Auch im Hinblick auf die parazelluläre Permeation von Stoffen mit geringem Molekulargewicht scheinen HNE kein optimales Modell der nasalen Mukosa zu sein. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte epitheliale Modell aus RPMI 2650 dagegen zeigte einen auf das Doppelte erhöhten Permeationskoeffizienten im Vergleich zur exzidierten Mukosa und kam damit den physiologischen Gegebenheiten deutlich näher. Das dreidimensionale Modell wies einen etwa 7fach erhöhten Permeationskoeffizienten auf, so dass es hier weniger gut für Permeationsuntersuchungen geeignet war als das reine Epithelmodell.

Tabelle 15: Permeationskoeffizienten verschiedener Markersubstanzen in den beschriebenen Modellen im Vergleich mit Literaturdaten von HNE-Modellen.

	Exzidierte Mukosa	Epitheliales Modell	Dreidimensionales Modell	HNE (Literatur)
Natrium-Fluorescein	$3,12 \pm 1,99 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (human)	$6,09 \pm 1,38 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$	$20,6 \pm 6,7 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$	$0,19 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Agu et al., 2001)
Propranolol-HCl	$2,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$ (Schwein, (Wadell et al., 2003)	$3,1 \pm 0,12 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$	$1,54 \pm 0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$	$1,6 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$ (Budesonid, (Lee et al., 2005)
FD4	$1,2 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Kaninchen, (Kubo et al., 1994)	$2,18 \pm 0,58 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$	$9,7 \pm 1,85 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$	$0,18 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ (Werner und Kissel, 1995)

Mit dem transzellulären Marker Propranolol-HCl wurden in dieser Arbeit Permeationskoeffizienten von $3,1 \pm 0,12 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$ für das epitheliale Standardmodell und $1,54 \pm 0,46 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$ für das dreidimensionale Standardmodell gemessen. Für exzidierte Mukosa wird ein Wert von $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ cm/s}$ berichtet (Wadell et al., 2003).

Der Unterschied zwischen HNE und exzidiierter Mukosa ist für die transzelluläre Permeation wesentlich geringer. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der transzellulären Permeation die Dichtigkeit der Tight Junctions eine untergeordnete Rolle spielt.

Mit dem in dieser Arbeit erreichten Permeationskoeffizienten von ca. $3,1 \cdot 10^{-5}$ cm/s lag das RPMI 2650-Epithelmodell leicht über dem Wert, der für exzidierte Mukosa beschrieben worden ist (Kubo et al., 1994; Wadell et al., 2003). Kubo et al. beschrieben für Kaninchenmukosa einen Wert von $2,6 \cdot 10^{-5}$ cm/s, Wadell et al. fanden bei porciner Mukosa $2,0 \pm 0,8 \cdot 10^{-5}$ cm/s. Daher erscheint das in dieser Arbeit beschriebene Modell auch für transzelluläre Permeationsuntersuchungen geeignet. Das dreidimensionale Modell war vermutlich aufgrund der dickeren hydrophilen Schicht des Kollagengels etwas geringer permeabel für Propranolol-HCl und eignet sich somit ebenfalls für Permeationsuntersuchungen. Im Vergleich zum Epithelmodell kommt es den physiologischen Verhältnissen sogar etwas näher.

Für den Modellstoff FD4 wurden in dieser Arbeit Permeationskoeffizienten von $2,18 \pm 0,58 \cdot 10^{-6}$ cm/s beim epithelialen Standardmodell und $9,7 \pm 1,85 \cdot 10^{-6}$ cm/s beim dreidimensionalen Standardmodell gemessen.

Wie bei der parazellulären Permeation von Natrium-Fluorescein sind isolierte respiratorische Epithelzellen wie z. B. HNE auch gegenüber einem Makromolekül, das parazellulär permeiert, wesentlich dichter als das RPMI 2650-Modell und als exzidierte Mukosa. In-vitro-Untersuchungen an exzidiierter Kaninchenmukosa resultierten in einem Permeationskoeffizienten von 1,275 bzw. $1,2 \cdot 10^{-6}$ cm/s für FD 4,400 (Kubo et al., 1994; Nakamura et al., 2002). Auch hier war also das RPMI 2650-Modell nahe an den physiologischen Verhältnissen.

Wie beschrieben, ist die nasale Applikation auch für Stoffe mit hohem Molekulargewicht eine vielversprechende Alternative zur intramuskulären oder subkutanen Anwendung. Einige Arzneimittel mit solchen Wirkstoffen sind bereits auf dem Markt (z. B. Calcitonin), andere Makromoleküle werden im Hinblick auf die nasale Bioverfügbarkeit intensiv untersucht, z. B. Insulin. Ein In-vitro-Modell für Permeationsuntersuchungen muss daher auch für diese Stoffe eine organotypische Barrierefunktion aufweisen. Das epitheliale Modell mit RPMI 2650-Zellen entsprach nach den Untersuchungen dieser Arbeit diesem Anspruch. Wie bei der parazellulären Permeation eines Modellstoffes mit niedrigem Molekulargewicht (Natrium-

Fluorescein) war das dreidimensionale Modell deutlich permeabler. Ein Grund könnte in der geringeren mechanischen Festigkeit und der Beanspruchung innerhalb des Versuchsaufbaus liegen.

5.7. Intraindividuelle Schwankungen der Permeationseigenschaften

Für humane Nasenschleimhaut ist beschrieben worden, dass die Verteilung der zilientragenden Zellen nicht gleichmäßig ist (Dahl und Mygind, 1998). Im vorderen Bereich der Nasenhöhle ist ihr Anteil wesentlich geringer als in den hinteren Bereichen, sowohl der Muscheln als auch der Seitenwände (bis zu 100 %). Wie beschrieben, ist die interzelluläre Verbindung zwischen zilientragenden Zellen größer als z. B. zwischen schleimbildenden Zellen, da erstere mehr Tight Junctions ausbilden können (Carson et al., 1987; Inagaki et al., 1985). Ein höherer Anteil dieser Zellen spricht daher für ein dichteres Epithel und damit höhere TEER-Werte und niedrigere Permeationskoeffizienten. Es liegt also die Vermutung nahe, dass innerhalb der Nasenhöhle bei ein und derselben Person nachweisbare Unterschiede in der Permeabilität bestehen. Diese Unterschiede können auch bei der Verwendung von Spendergewebe für Permeationsuntersuchungen zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen führen. Da es nicht möglich ist, vom selben (lebenden) Spender ausreichend Mukosa aus verschiedenen Arealen der Nasenhöhle zu entnehmen, sollte anhand von Schweinenasenschleimhaut untersucht werden, ob sich diese Unterschiede nachweisen lassen. Unterschiede der Permeabilität innerhalb der Nasenhöhle könnten bei der Applikation bzw. Entwicklung verschiedener Darreichungsformen einen massiven Einfluss auf die Bioverfügbarkeit haben, je nachdem, welchen Bereich der Nasenschleimhaut der Arzneistoff erreicht.

5.7.1. Präparation von porcinem Gewebe

Bei der Präparation des porcinen Gewebes traten andere Schwierigkeiten als bei dem humanen Gewebe auf. Hier war weniger die präparierbare Menge/Fläche bzw. die mögliche Probenzahl problematisch, sondern vielmehr erstens das Erreichen des Entnahmeortes (siehe Tabelle 16) und zweitens die Dicke der präparierten Proben. Je nach Entnahmeort variierte die Dicke vor allem der Bindegewebsschicht, die mit abgelöst wurde. Diese Schicht von der Probe zu entfernen, ohne das Epithel zu beschädigen, war nicht möglich. Aus diesem Grund geht die Gesamtdicke des zu untersuchenden Gewebestückes im Folgenden in die Ergebnisse mit ein.

Aufgrund der Ergebnisse, die zur Verteilung der Zellarten in humaner Nasenschleimhaut vorliegen (Dahl und Mygind, 1998) wäre zu erwarten, dass Proben aus dem hinteren Bereich der Nasenhöhle eine höhere Barrierefunktion aufweisen als die aus den vorderen Bereichen. Zudem könnten die Schwankungen

in der unteren Muschel stärker sein, während in den oberen Bereichen die zilientragenden Zellen gleichmäßiger verteilt sind und damit die Permeabilität gleichbleibend sein müsste. Wadell et al. beschreiben bereits für porcines Gewebe, dass die Schwankungen des TEER-Wertes bei Proben von der Nasenscheidewand höher sind als bei Proben aus der Nasenhöhle (Wadell et al., 1999).

Tabelle 16: Entnahmeorte aus der Schweinenase.

- 1 hinter den Muscheln vorn (äußere Nasenwand)
- 2 untere Muschel vorn
- 3 untere Muschel Mitte
- 4 untere Muschel hinten
- 5 hinter den Muscheln hinten (äußere Nasenwand)
- 6 obere Muschel vorn
- 7 obere Muschel Mitte
- 8 obere Muschel hinten
- 9 Nasenscheidewand vorn
- 10 Nasenscheidewand hinten

5.7.2. TEER-Messungen

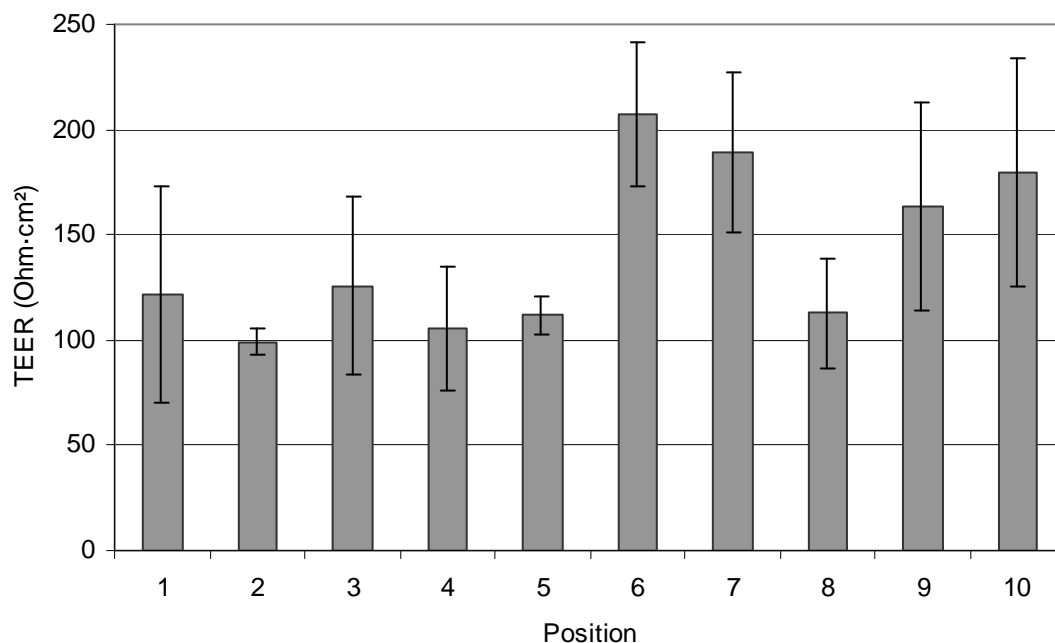


Abbildung 5.41 TEER (in $\Omega\cdot\text{cm}^2$) von exzidiert porcin Mukosa vor der Permeation, abhängig vom Entnahmeort (siehe 3.2.3.2), MW \pm SD, n \geq 3.

In der vorliegenden Arbeit wurden TEER-Werte von durchschnittlich $147 \pm 51 \Omega\cdot\text{cm}^2$ mit einer Spannweite von 99 (Position 2, untere Muschel vorn) bis $207 \Omega\cdot\text{cm}^2$

(Position 6, obere Muschel vorn) erreicht (Abbildung 5.41). Tendenziell lassen sich die Proben in zwei Gruppen aufteilen:

Zum einen findet man eine Gruppe mit Werten von 99 bis 126 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Positionen 1 bis 5 und 8), zum anderen eine Gruppe mit Werten von 164 bis 207 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Positionen 6, 7, 9 und 10). Aufgrund der zum Teil großen Schwankungen sind diese Gruppen jedoch nicht signifikant voneinander abzugrenzen.

Die Positionen 6 und 7 zeichneten sich bei der Präparation dadurch aus, dass das Bindegewebe relativ dick und schwierig zu entfernen war. Die hohen Werte sind also auch darauf zurückzuführen.

Eine Tendenz steigender Barriereigenschaften von vorn nach hinten war nicht zu beobachten. In der oberen Muschel haben die Proben aus dem hinteren Bereich sogar einen niedrigeren TEER-Wert, was hier jedoch ebenfalls an der Dicke der Proben liegen kann. Ebenso bestätigte sich nicht, dass die Schwankungen in der oberen Muschel kleiner sein würden. Trotzdem sind Unterschiede zwischen den Entnahmeorten zu erkennen. Proben aus dem oberen Bereich der Nasenhöhle (Positionen 6 und 7) und von der Nasenscheidewand (Position 9) zeigten signifikant höhere TEER-Werte ($p \leq 0,05$) als die aus der unteren Nasenmuschel (Position 2).

5.7.3. Permeationsuntersuchungen mit Natrium-Fluorescein

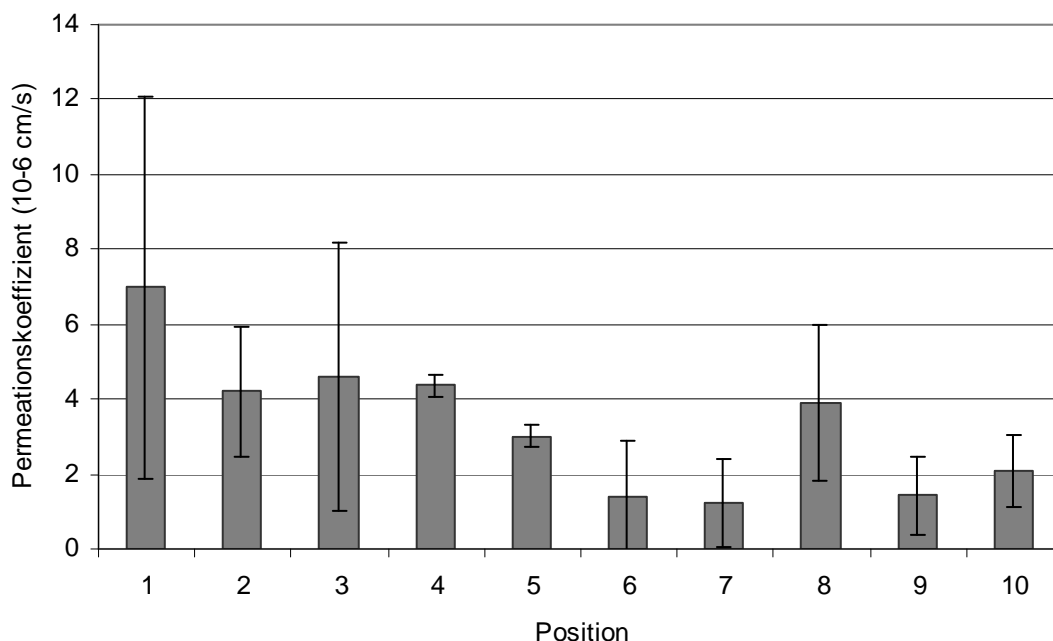


Abbildung 5.42 Permeationskoeffizient (in $1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) von Natrium-Fluorescein durch exzidierte porcine Mukosa, abhängig vom Entnahmeort, MW \pm SD, $n \geq 2$.

Die ermittelten Permeationskoeffizienten waren in Einklang mit den Ergebnissen der TEER-Messungen. Die Positionen 6, 7, 9 und 10 zeigten eine niedrigere Permeabilität als die anderen Positionen (Abbildung 5.42). Den niedrigsten Permeationskoeffizienten erreichte Position 7 ($1,24 \pm 1,19 \cdot 10^{-6}$ cm/s), den höchsten Position 1 ($6,98 \pm 5,13 \cdot 10^{-6}$ cm/s). Der Durchschnittswert betrug $3,61 \pm 3,53 \cdot 10^{-6}$ cm/s. Alle Werte wiesen starke Schwankungen auf. Um die mögliche Signifikanz der Unterschiede nachzuweisen, müsste die Anzahl der Versuche erhöht werden. Dies war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Es zeigte sich aber die Tendenz, dass Proben aus dem oberen Teil der Nasenhöhle und von der Nasenscheidewand etwas weniger permeabel waren. Bei der Nasenscheidewand ist die Schleimhaut möglicherweise auch aufgrund der größeren Belastungen durch Luftzug etc. stärker verhornt und damit dicker und weniger permeabel.

5.7.4. Zusammenfassende Diskussion der intraindividuellen Schwankungen

Vergleicht man die hier erzielten Ergebnisse mit den in den Kapiteln 5.5.1 und 5.6.1.1 beschriebenen für exzidierte humane Mukosa, so findet man eine gute Übereinstimmung (siehe Tabelle 17). Porcine Mukosa stellt also in dieser Hinsicht ein geeignetes Modell dar, um auch auf die Verhältnisse beim Menschen Rückschlüsse zu ziehen.

Tabelle 17: Vergleich der Durchschnittswerte von exzidiierter humaner und porciner Mukosa.

	Humane Mukosa (n=4)	Porcine Mukosa
TEER ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	128 ± 35	147 ± 51 (n=41)
P_{app} von Natrium-Fluorescein (10^{-6} cm/s)	$3,12 \pm 1,99$	$3,61 \pm 3,53$ (n=34)

Erwartet wurde, dass Proben aus dem hinteren und oberen Bereich eine höhere Barrierefunktion und geringere Schwankungen aufwiesen. Auch wenn die erzielten Ergebnisse nicht mit diesen Erwartungen übereinstimmen, lassen sich intraindividuelle Unterschiede der Permeabilität an verschiedenen Positionen erkennen. Möglich ist, dass beim Schwein die Unterschiede in der Zellverteilung anders oder weniger groß sind als beim Menschen, möglich ist auch, dass die Zellverteilung weniger Einfluss auf die Barrierefunktion hat als angenommen.

Wadell et al. beschreiben ebenfalls leichte Unterschiede zwischen porcinen Proben von der Nasenscheidewand (Septum) und aus der Nasenhöhle (Wadell et al., 1999).

Nicht dermatomisiertes Septum-Gewebe ist deutlich weniger permeabel für Mannitol als Gewebe aus der Nasenhöhle. Nach der Dermatomisierung ist es umgekehrt.

Die hier erzielten Ergebnisse sprechen dafür, dass auch beim Menschen intraindividuelle Unterschiede vorhanden sind. Die Abstufung der Permeabilitäten und das Ausmaß der Schwankungen können bei humaner Nasenschleimhaut anders sein als beim Schwein. Dennoch dürften diese intraindividuellen Schwankungen auch beim Menschen zu beobachten sein. Sie sind ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Entwicklung nasaler Darreichungsformen, die je nach Technologie und Applikationsart verschieden weit in die Nasenhöhle hineingelangen. Bei systemisch wirkenden Arzneistoffen kann dies die Absorption und damit die Bioverfügbarkeit deutlich beeinflussen.

5.8. Charakterisierung der Expression ausgewählter ABC-Transporter

Neben der passiven Permeation spielt auch in der Nasenschleimhaut der aktive Transport durch ABC-Efflux-Transporter eine Rolle. ATP-binding-cassette (ABC) Proteine bilden die größte Gruppe der transmembranären Proteine. Sie binden ATP und transportieren mit Hilfe dieser Energie verschiedenste Stoffe durch Zellmembranen.

In der humanen nasalen Mukosa sind verschiedene ABC-Transporter nachgewiesen worden. Hurbain et al. fanden mit Hilfe von RT-PCR in humaner Mukosa die Transporter in folgender mengenmäßiger Abstufung: MRP5 > MRP1 > MRP4 > MRP3 > MDR1, MRP2 war nicht detektierbar. Wioland et al. wiesen zudem den CFTR-Transporter nach (Hurbain et al., 2003; Kandimalla und Donovan, 2005; Wioland et al., 2000). In dieser Arbeit sollte nun die mRNA-Expression der Transporter MDR1, MRP1-5 und CFTR in den entwickelten Modellen mittels PCR-Untersuchung charakterisiert werden. Zusätzlich wurde MDR1 mittels vergleichendem bidirektionalem Transport charakterisiert. Hierfür steht eine Markersubstanz zur Verfügung, das Rhodamin 123, daneben auch ein Hemmstoff des Transporters, das Verapamil-HCl.

5.8.1. Rhodamin 123-Permeation

Als Markersubstanz für den MDR1-Transporter wurde Rhodamin 123 ausgewählt. Es wurde zum einen die Permeation von apikal nach basolateral (ab) untersucht, zum anderen von basolateral nach apikal (ba). Um einen etwaigen Unterschied der Permeationsgeschwindigkeit auf den Transporter zurückführen zu können, wurde zudem der MDR1-Hemmstoff Verapamil-HCl eingesetzt (siehe 4.2.2.5).

Falls der Transporter gerichtet exprimiert wird, so pumpt er sein Substrat von basolateral nach apikal, diese Geschwindigkeit sollte also im Modell höher sein als die in umgekehrte Richtung. Beim Zusatz von Verapamil-HCl sollten sich dann die beiden Geschwindigkeiten angleichen. Wird der Transporter ungerichtet exprimiert, lässt er sich in Permeationsuntersuchungen nicht nachweisen.

5.8.1.1. Epitheliale Modelle mit RPMI 2650

Untersucht wurden wie bei den anderen Permeationsuntersuchungen das Standardmodell, das Modell mit HNF-Kokultur und das Modell auf kollagenbeschichtetem Filter. Auch der Serumgehalt wurde wie bereits beschrieben

variiert, es wurden 2 % bzw. 10 % Serum verwendet. Alle Varianten wurden sowohl submers als auch an der Luft-Medium-Grenze kultiviert. Deutlich zu erkennen ist, dass submers kultivierte Modelle einen sehr hohen Permeationskoeffizienten besaßen, der dem eines leeren Filters entsprach (Blank) (Abbildung 5.43). Dies war unabhängig von der Permeationsrichtung und der Zugabe eines Inhibitors, weil die Permeation völlig unabhängig von den Zellen durch die freien Teile des Filters erfolgte, so wie es auch für Natrium-Fluorescein beobachtet wurde.

Betrachtet man nun die ALI-Kulturen, so ist festzustellen, dass die Permeationskoeffizienten in der Reihenfolge Standardmodell – HNF-Kokultur – Kollagenbeschichtung anstiegen, und zwar für alle Permeationsvarianten. Die relativ hohen Permeationsraten bei Kollagenbeschichtung waren vermutlich auf das teilweise Ablösen der Kollagenschicht beim Mediumwechsel bzw. Spülen zurückzuführen. Bei der HNF-Kokultur war evt. die Vitalität der Zellen am Ende der Kultivierungszeit geringer, weil durch die zusätzlichen Zellen das Medium jeweils schneller verbraucht wurde. Auch bei den Messungen des TEER-Wertes (siehe 5.5.2.5) zeigten HNF-Kokulturen einen niedrigeren Wert als das Standardmodell und damit eine geringere Barrierefunktion.

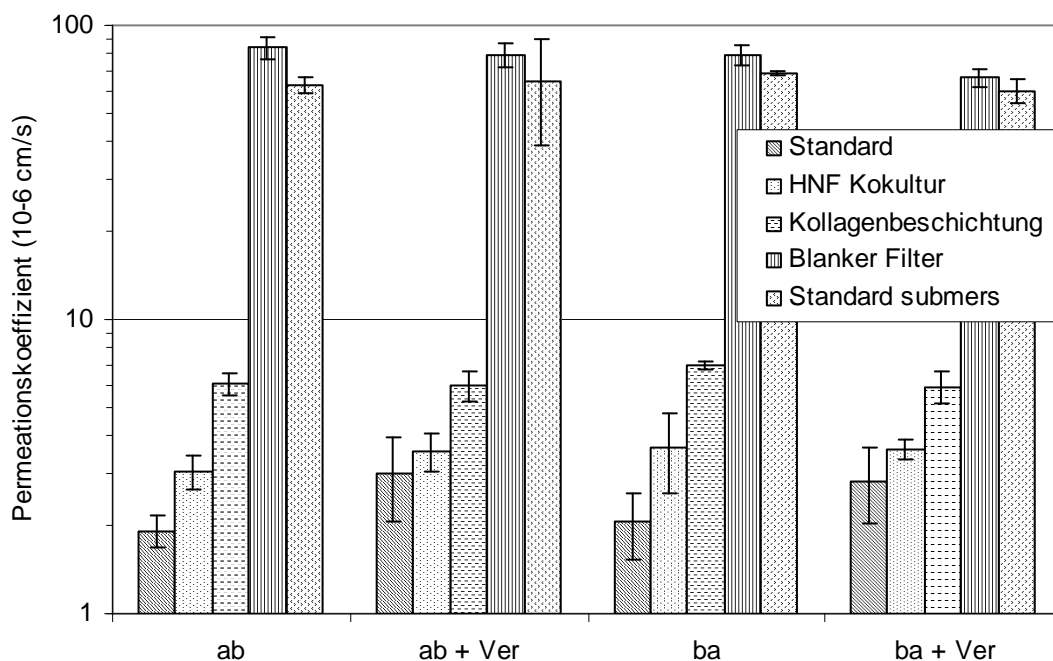


Abbildung 5.43 Permeationskoeffizient von Rhodamin 123 (in 1×10^{-6} cm/s) durch epitheliale Modelle, kultiviert mit 10 % Serum. (ab: apikal nach basolateral, ba: basolateral nach apikal, Ver: Zusatz des Inhibitors Verapamil-HCl), MW \pm SD, n=3.

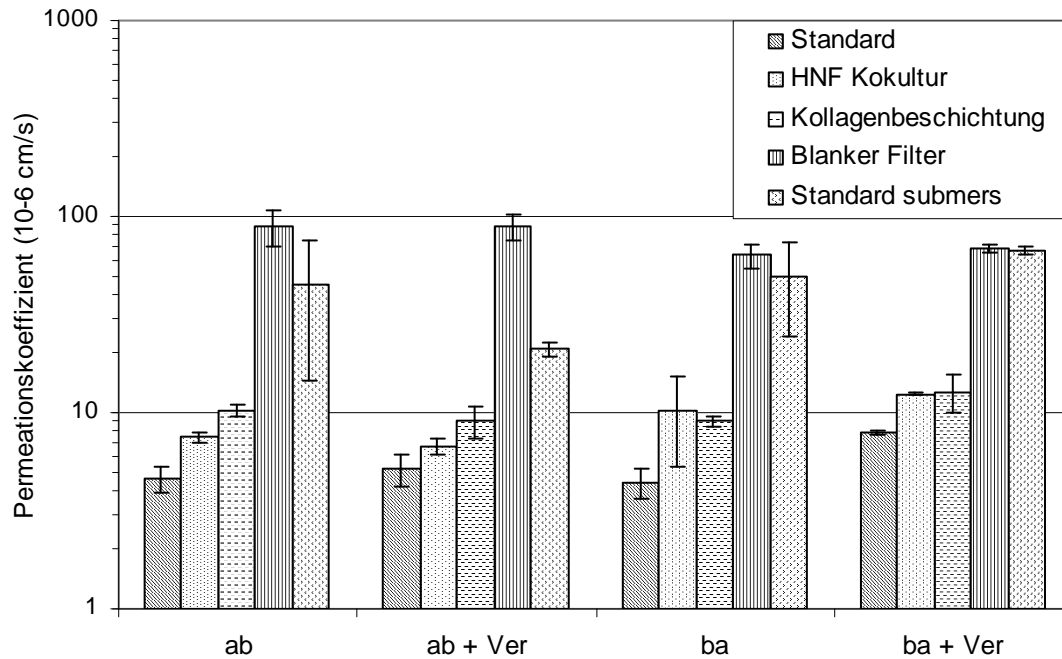


Abbildung 5.44 Permeationskoeffizient von Rhodamin 123 (in 1×10^{-6} cm/s) durch epitheliale Modelle, kultiviert mit 2 % Serum. (ab: apikal nach basolateral, ba: basolateral nach apikal, Ver: Zusatz des Inhibitors Verapamil-HCl), MW \pm SD, n=3.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Permeationsrichtungen war nicht nachweisbar, eine gerichtete Expression des MDR1-Transporters also zunächst nicht nachzuweisen. Beim Zusatz des Inhibitors Verapamil-HCl veränderte sich die Permeationsgeschwindigkeit ebenfalls nicht signifikant.

Die gleichen Ergebnisse zeigten sich bei der Kultivierung mit 2 % Serum, hier waren die Permeationskoeffizienten gegenüber der mit 10 % Serum leicht erhöht (Abbildung 5.44).

5.8.1.2. Dreidimensionale Modelle

Untersucht wurden Modelle mit und ohne HNF sowie mit und ohne RPMI 2650. Aufgrund der schlechteren Handhabbarkeit und Stabilität der Modelle ohne HNF ergaben sich hier keine reproduzierbaren Ergebnisse. Diese Daten waren daher nicht auswertbar. Modelle ohne Epithelzellen zeigten tendenziell höhere Permeationskoeffizienten als diejenigen mit RPMI 2650 (Abbildung 5.45). Die Permeationsgeschwindigkeit von Rhodamin 123 war nicht abhängig von der Permeationsrichtung. Auch der Zusatz des MDR1-Inhibitors Verapamil-HCl bewirkte keine Veränderung der Permeationskoeffizienten. Auch im dreidimensionalen Modell schien dieser Transporter nicht gerichtet exprimiert zu werden.

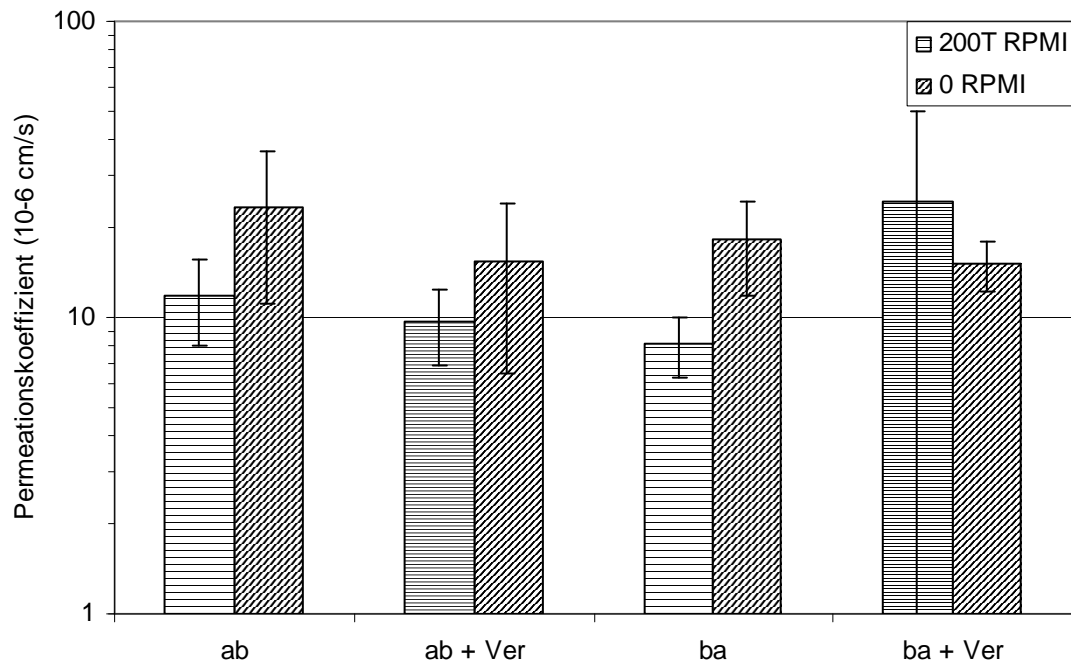


Abbildung 5.45 Permeationskoeffizient von Rhodamin 123 (in 1×10^{-6} cm/s) durch dreidimensionale Modelle mit jeweils 50.000 HNF, 3 Wochen nach Aufsaat der Epithelzellen. (ab: apikal nach basolateral, ba: basolateral nach apikal, Ver: Zusatz des Inhibitors Verapamil-HCl), MW \pm SD, n=3.

Für humane bronchiale Epithelzellen (16HBE14o), CaLu-Zellen und humane alveolare Epithelzellen (hAEpC) wurden deutlich höhere Permeationsgeschwindigkeiten von basolateral nach apikal als in die umgekehrte Richtung beschrieben (Ehrhardt, 2003; Ehrhardt et al., 2003; Hamilton et al., 2001), was für eine Expression von MDR1 in diesen respiratorischen Epithelzellen spricht. Für nasale Epithelzellen ist dies noch nicht beschrieben worden. In exzidiierter humaner nasaler Mukosa wurde MDR1 immunhistochemisch im Epithel nachgewiesen, insbesondere in zilientragenden und Basalzellen sowie in Drüsenzellen. Ob dort ein gerichteter Transport stattfand, konnte aus den immunhistochemischen Färbungen nicht abgeleitet werden (Wioland et al., 2000).

5.8.2. PCR-Untersuchungen

5.8.2.1. RNA-Isolierung

Zellkulturen

Die RNA-Isolierung aus submersen Zellkulturen in der Wachstumsphase war mit der beschriebenen Methode problemlos möglich. Für RPMI 2650 wurde eine RNA-Konzentration in der Lösung zur Weiterverwendung von ca. 600 µg/ml erreicht, für CaLu-3 ca. 330 µg/ml.

Epitheliale Modelle

Die RNA-Ausbeute aus epithelialen Modellen war etwas niedriger als die aus submersen Zellkulturen in der Wachstumsphase. Das Ablösen und Weiterverarbeiten der Zellen vom Filter war zwar ohne weiteres möglich, jedoch ist zu vermuten, dass sich ein geringerer Anteil der verwendeten Zellen in der Synthesephase befand, sie also weniger mRNA enthielten als die Zellen, die in ihrer Wachstumsphase geerntet wurden. Es wurden Konzentrationen zwischen 210 und 424 µg/ml RNA erreicht.

Dreidimensionale Modelle

Die RNA-Isolierung aus Konstrukten war mit der beschriebenen Methode erfolgreich. Die Ausbeute schwankte hier zwischen 650 und 1270 µg/ml RNA.

Alle erhaltenen RNA-Lösungen wurden auf die beschriebene Weise einer reversen Transkription unterzogen, und die erhaltenen cDNA dann als Template für die PCR verwendet.

5.8.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die Expression der ausgewählten Transporter wurde jeweils in folgenden Proben/Modellen untersucht:

1	RPMI 2650
2	Epithelmodell ohne HNF ohne Kollagen + ALI
3	Epithelmodell ohne HNF ohne Kollagen – ALI
4	Epithelmodell mit HNF ohne Kollagen + ALI
5	Epithelmodell mit HNF ohne Kollagen – ALI
6	Epithelmodell ohne HNF mit Kollagen + ALI
7	Epithelmodell ohne HNF mit Kollagen – ALI
8	Konstrukt 50.000 HNF + 200.000 RPMI 2650
9	Konstrukt 200.000 HNF + 200.000 RPMI 2650

Zusätzlich wurden CaCo-2-Zellen als Positivprobe beim ABCB1 und ABCC1-5 verwendet. CaLu-3-Zellen dienten als Positivkontrolle beim CFTR-Transporter. Eine Negativprobe mit DEPC-Wasser als Template wurde ebenfalls mitprozessiert.

5.8.2.2.1.MDR1 (ABCB1) (pGP)

Mit der beschriebenen Methode wurde eine deutliche und klare Bande bei ca. 220 bp für die Positivkontrolle erreicht. Alle anderen Proben zeigten diese Bande nicht. Lediglich bei Probe 1 (RPMI 2650) war unter UV-Licht eine schwache Bande zu erkennen, insbesondere aber eine starke Nebenbande bei ca. 150 bp (Abbildung 5.46). Daher wurden die PCR-Produkte einer weiteren PCR unterzogen. Auch nach dieser Reamplifizierung waren keine Banden zu erkennen, auch die Nebenbande war kaum noch sichtbar (Abbildung 5.47). Die mRNA-Expression des MDR1-Transporters war also in keiner der Proben nachzuweisen. Dies entspricht den Ergebnissen der Permeationsuntersuchungen, die ebenfalls keine Aktivität dieses Transporters nachweisen konnten.

5.8.2.2.2.MRP1 (ABCC1)

Mit der beschriebenen Methode wurde eine deutliche und klare Bande bei ca. 183 bp für die Positivkontrolle erreicht. Alle durchgeführten Versuche zeigten auch bei der Negativprobe stets eine Bande, trotz Verwendung neuer Chargen aller einzelnen Bestandteile (Abbildung 5.48). Eine abschließende Bewertung ist daher nicht möglich. Die Banden der Proben 1, 4, 5, 8 und 9 sowie der Positivprobe waren jedoch im Vergleich zu denen der anderen Proben etwas stärker.

5.8.2.2.3.MRP2 (ABCC2)

Die beschriebene Methode führte zu einer klaren Bande bei 211 bp bei der Positivprobe. Die Negativprobe zeigte keine Bande (Abbildung 5.49).

Eine schwache Bande war unter UV-Licht bei den Proben 1, 4, 5 und 8 zu erkennen. Auch hier wurde eine Reamplifizierung durchgeführt. Danach war die entsprechende Bande bei allen Proben deutlich erkennbar, besonders stark bei Probe 1, 4 und 5 (Abbildung 5.50).

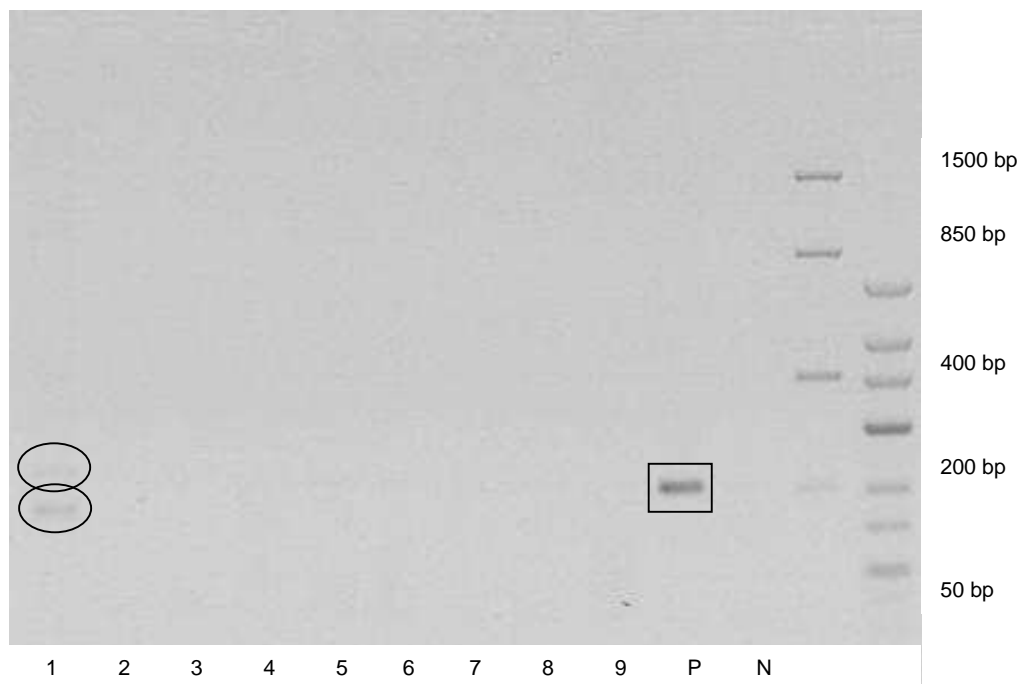


Abbildung 5.46 MDR1: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

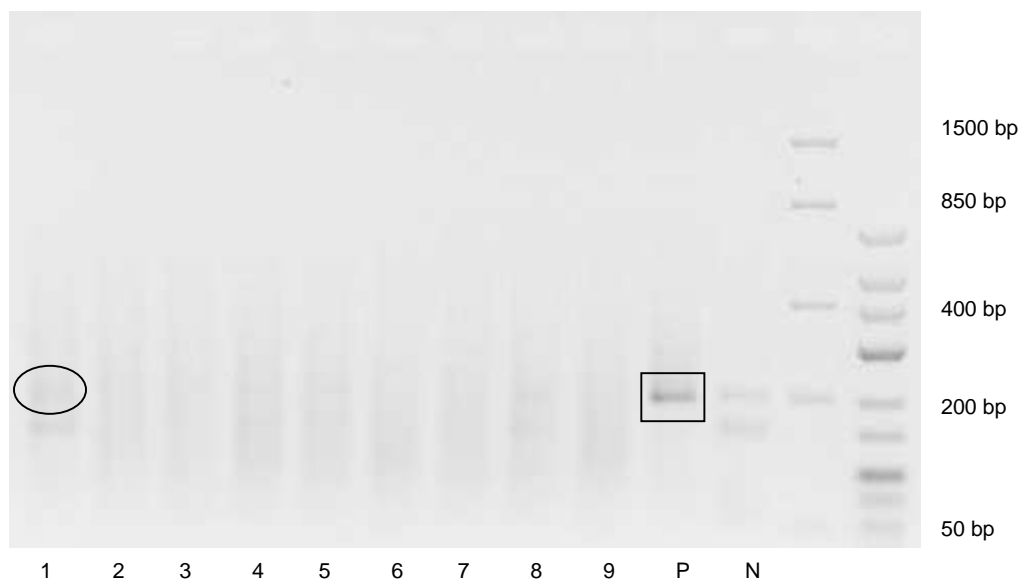


Abbildung 5.47 MDR1: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte der Reamplifikation, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

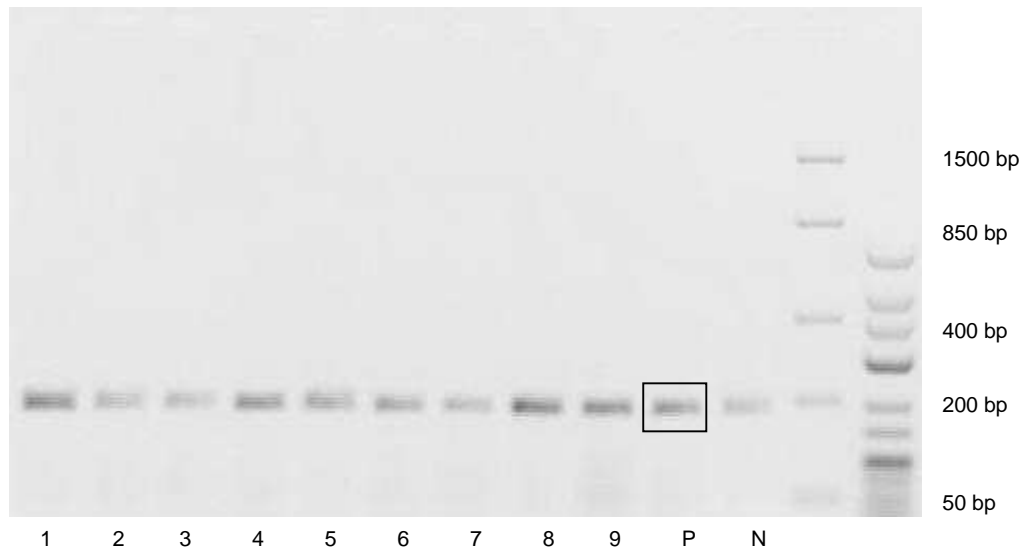


Abbildung 5.48 MRP1: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe.

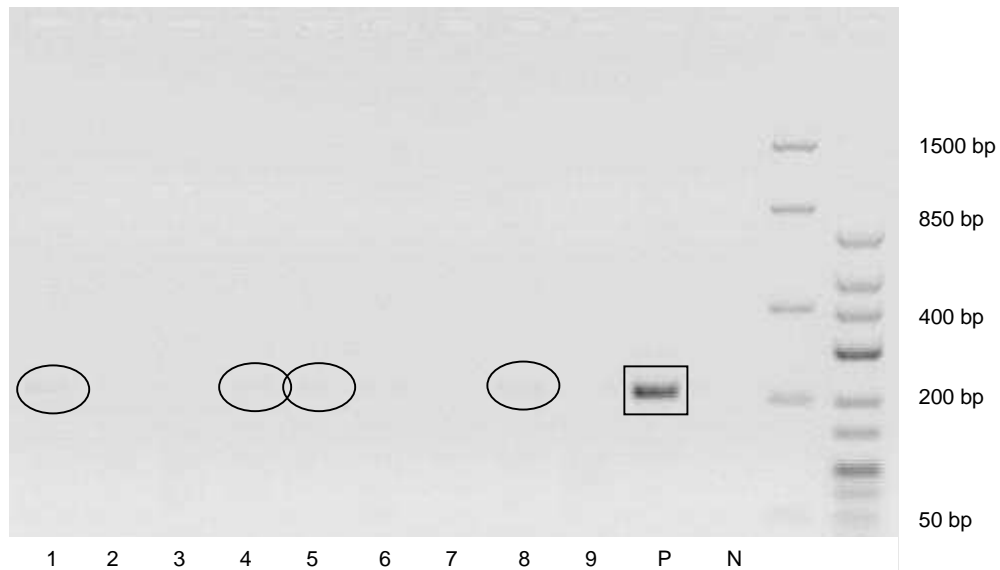


Abbildung 5.49 MRP2: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

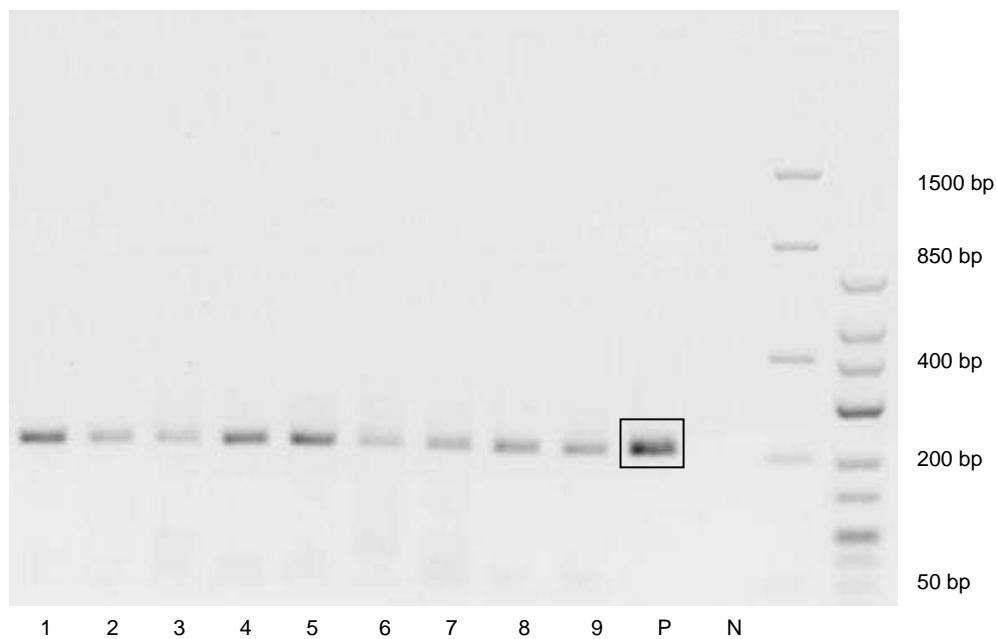


Abbildung 5.50 MRP2: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte der Reamplifikation, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe.

5.8.2.2.4.MRP3 (ABCC3)

Die beschriebene Methode führte zu einer klaren Bande bei 187 bp bei der Positivprobe. Die Negativprobe zeigte keine Bande. Die Proben zeigten keine deutliche Bande, nur bei Probe 1 war unter UV-Licht eine schwache Bande zu erkennen (Abbildung 5.51).

Nach der Reamplifikation war bei allen Proben eine Bande zu erkennen, besonders stark bei Proben 1, 4, 5, 7 und 8. Zum Teil zeigte sich aber auch eine Nebenbande, die aber auch bei der Positivprobe auftrat (Abbildung 5.52).

5.8.2.2.5.MRP4 (ABCC4)

Mit der beschriebenen Methode wurde eine deutliche und klare Bande bei 239 bp für die Positivkontrolle erreicht (Abbildung 5.53). Die Negativprobe zeigte keine Bande. Eine starke Bande zeigte sich zudem bei den Proben 1 und 8, eine mittelstarke bei den Proben 4 und 5, eine schwächere bei 6 und 9.

5.8.2.2.6.MRP5 (ABCC5)

Mit der beschriebenen Methode wurde eine deutliche und klare Bande bei 529 bp für die Positivkontrolle erreicht (Abbildung 5.54). Die Negativprobe zeigte keine Bande. Eine starke Bande zeigte sich zudem bei den Proben 1, 4, 5 und 8. Die anderen Proben entwickelten keine Bande.

5.8.2.2.7.CFTR (ABCC7)

Die beschriebene Methode führte zu einer klaren Bande bei 198 bp bei der Positivprobe (Abbildung 5.55). Die Negativprobe zeigte keine Bande. Die Proben zeigten alle unter UV-Licht eine schwache Bande bei 198 bp, die bei Probe 1, 5 und 8 etwas stärker war, bei Probe 9 ähnlich wie bei der Positivkontrolle. Nach der Reamplifikation war diese Bande jeweils wesentlich deutlicher, bei der Probe 2 jedoch weiterhin sehr schwach (Abbildung 5.56).

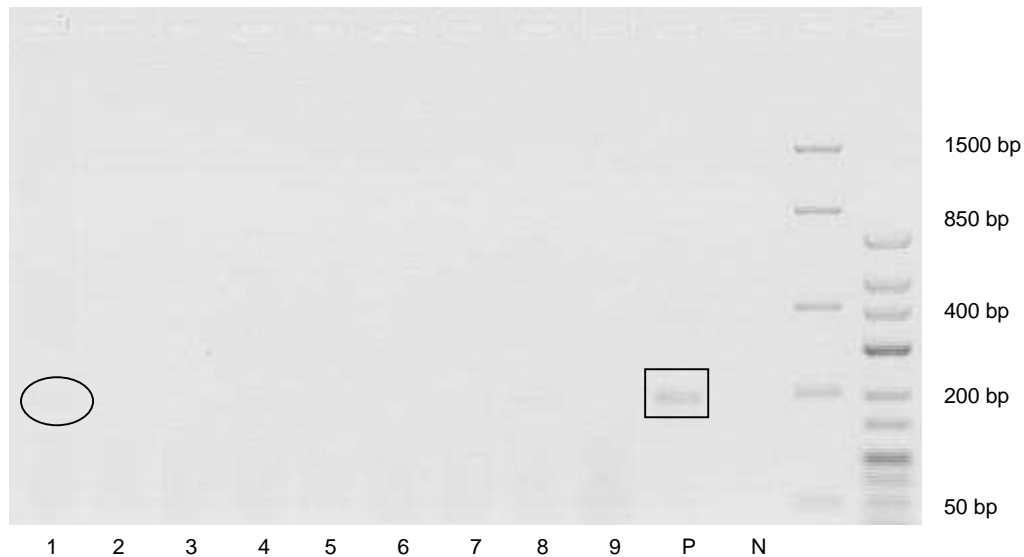


Abbildung 5.51 MRP3: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

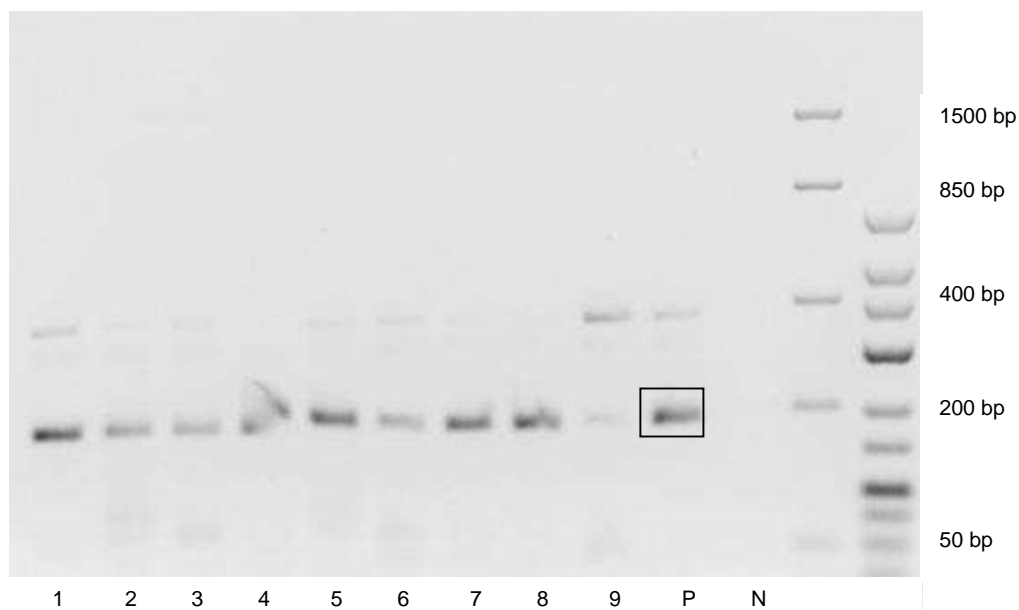


Abbildung 5.52 MRP3: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte der Reamplifikation, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe.

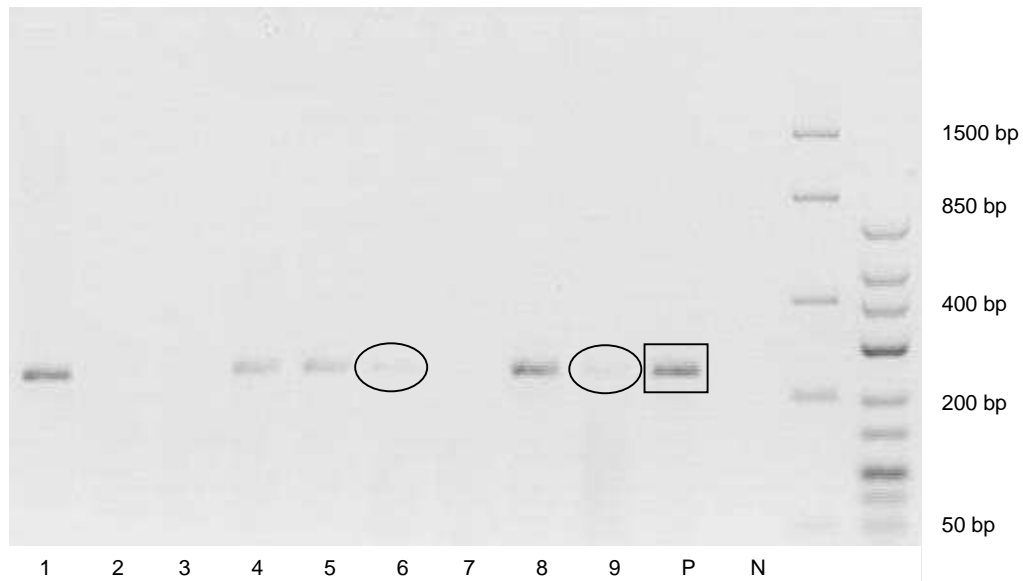


Abbildung 5.53 MRP4: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

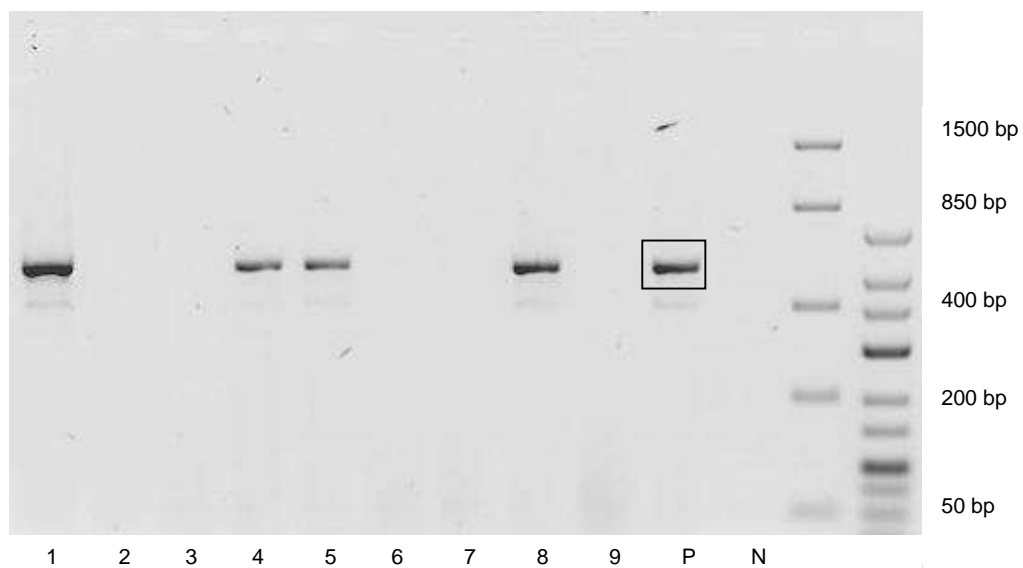


Abbildung 5.54 MRP5: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe.

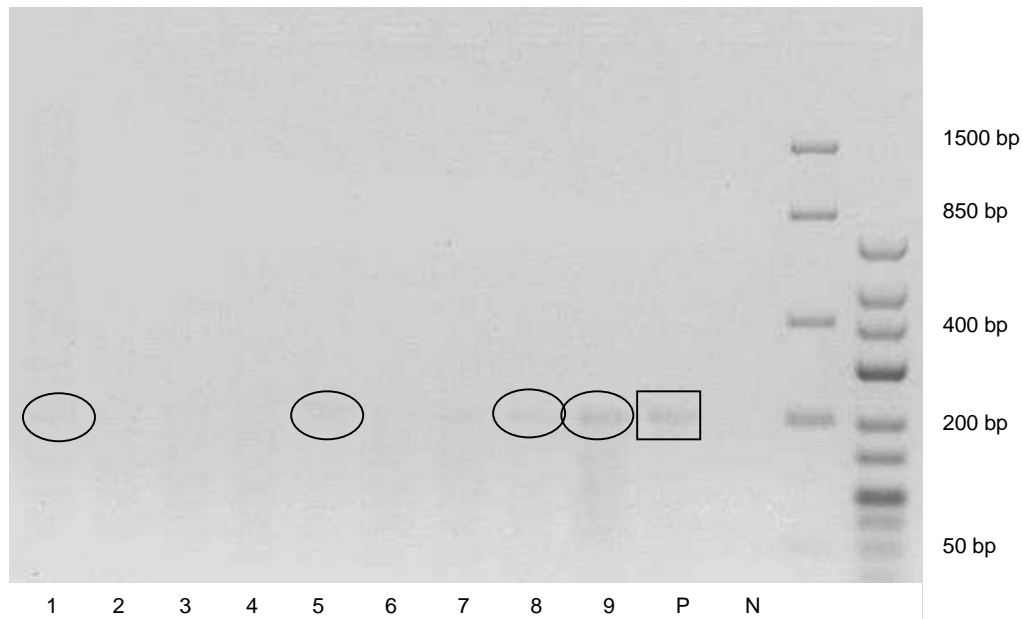


Abbildung 5.55 CFTR: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe, ○: Schwache Banden.

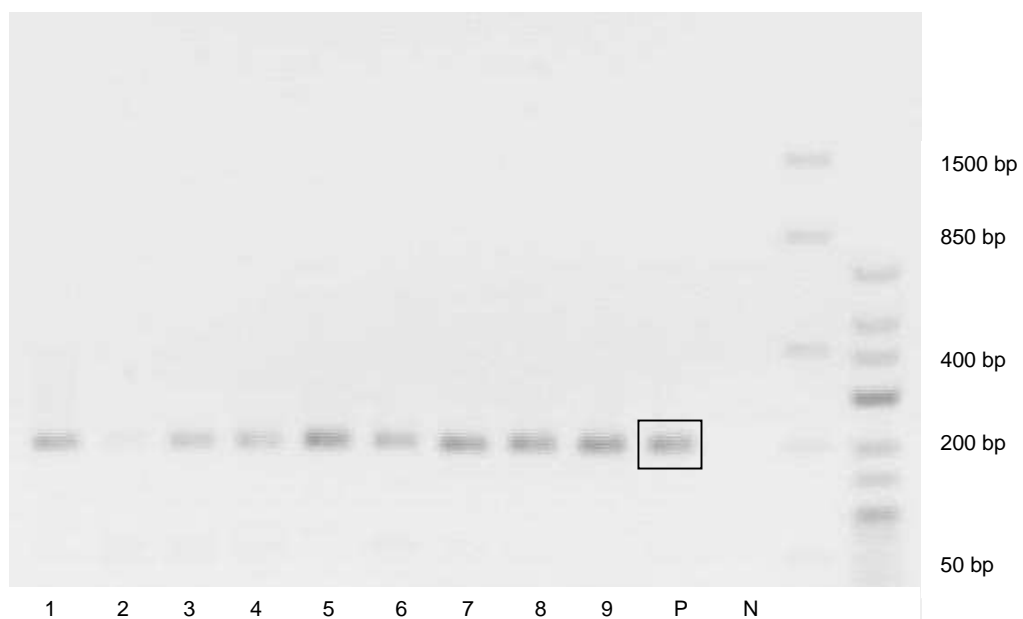


Abbildung 5.56 CFTR: Gelelektrophoretischer Nachweis der PCR-Produkte der Reamplifikation, von links nach rechts: Proben 1 bis 9, Positiv, Negativ, DNA-Leitern (Fast Ruler, Gene Ruler), □: Positivprobe.

5.8.3. Zusammenfassende Diskussion der Transporterexpression

Eine gerichtete Expression des MDR1-Transporters konnte in den RPMI 2650-Modellen mittels Permeationsuntersuchungen des Substrates Rhodamin 123 nicht nachgewiesen werden. In exzidiierter boviner Mukosa ist eine solche Expression allerdings mit einem anderen Modellstoff (Etoposid) beschrieben worden (Kandimalla und Donovan, 2005). Auch verschiedene humane respiratorische Zellarten (CaLu-3, 16HBE14o) haben in Permeationsuntersuchungen mit Rhodamin 123 eine Aktivität dieses Transporters gezeigt (Ehrhardt, 2003; Ehrhardt et al., 2003; Hamilton et al., 2001). In humaner nasaler Mukosa jedoch ist diese Aktivität noch nicht beschrieben worden. Mallants et al. beschrieben für HNE ebenfalls keinen richtungsabhängigen Unterschied in der Permeationsgeschwindigkeit für Atenolol als MDR1-Substrat (Mallants et al., 2009). Unterschiede zwischen den Spezies und zwischen den Eigenschaften verschiedener respiratorischer Epithelzellen (nasal, bronchial, alveolar) sind hier zu vermuten. In einer umfassenden Untersuchung von Langmann et al. wurden bereits die Unterschiede der Expression humaner ABC-Transporter in verschiedensten, u. a. auch respiratorischen Geweben mittels real-time PCR herausgearbeitet (Langmann et al., 2003). Hier zeigten sich unter anderem auch deutliche Unterschiede zwischen Lungen- und Trachea-Gewebe.

Ein Überblick über die untersuchten Modelle und die ermittelte Expression der mRNA der ausgewählten Transporter wird in Tabelle 18 und Tabelle 19 gegeben.

In RPMI 2650-Zellen aus submerser Kultur in der Wachstumsphase war die Expression der mRNA aller Transporter bis auf MDR1 mittels PCR nachweisbar. In den verschiedenen Permeationsmodellen, in denen die Epithelzellen weiter differenziert sind, war die Expression der einzelnen Transporter jedoch deutlich unterschiedlich. Im Standard-Epithelmodell waren lediglich MRP2 und MRP3 nachweisbar, jedoch erst nach Reamplifikation. Unterschiede zwischen den Modellen mit und ohne ALI (Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze) waren nicht erkennbar. Die Modelle mit HNF-Kokultur zeigten eine deutlich stärkere Expression von MRP2, MRP3 und insbesondere MRP4 und MRP5. Im dreidimensionalen Standardmodell konnten MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 und CFTR nachgewiesen werden. Eine Kultivierung der RPMI 2650 auf Polycarbonatfiltern bzw. einem Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten schien also eine Differenzierung in der mRNA-Expression einiger Transporter zu fördern.

Tabelle 18: Zellkulturen bzw. Permeationsmodelle, in denen die mRNA-Expression untersucht wurde (ALI: Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze).

1	RPMI 2650	
2	Epithelmodell ohne HNF ohne Kollagen + ALI	Standard-Epithelmodell
3	Epithelmodell ohne HNF ohne Kollagen – ALI	
4	Epithelmodell mit HNF ohne Kollagen + ALI	
5	Epithelmodell mit HNF ohne Kollagen – ALI	
6	Epithelmodell ohne HNF mit Kollagen + ALI	
7	Epithelmodell ohne HNF mit Kollagen – ALI	
8	Konstrukt 50.000 HNF + 200.000 RPMI 2650	Standard-Konstrukt
9	Konstrukt 200.000 HNF + 200.000 RPMI 2650	

Tabelle 19: Expression der mRNA ausgewählter Transporter in den verschiedenen Permeationsmodellen der nasalen Mukosa (siehe Tabelle 18). „++“: Bande gleich stark oder stärker als Positivprobe; „+“: Bande schwächer als Positivprobe, aber deutlich; „(+“: Bande sehr schwach; „-“: keine Bande erkennbar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MDR1	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
MDR1 reampl.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MRP2	+	-	-	(+)	(+)	-	-	(+)	-
MRP2 reampl.	++	+	+	++	++	+	+	+	+
MRP3	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
MRP3 reampl.	++	+	+	++	++	+	++	++	(+)
MRP4	++	-	-	+	+	(+)	-	++	(+)
MRP5	++	-	-	++	++	-	-	++	-
CFTR	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	(+)	+	+
CFTR reampl.	++	(+)	+	+	++	+	++	++	++

Hurbain et al. fanden in humaner Mukosa mit Hilfe von RT-PCR die mRNA der Transporter in der erwähnten mengenmäßigen Abstufung: MRP5 > MRP1 > MRP4 > MRP3 > MDR1, MRP2 war nicht detektierbar. Wioland et al. wiesen über immunhistochemische Färbung humaner nasaler Mukosa zudem den CFTR-Transporter nach, der bei der Cystischen Fibrose eine Rolle spielt. Kandimalla et al. führten Permeationsuntersuchungen an exzidiertem boviner Mukosa mit einem pGP-Substrat durch, die auf das Vorhandensein dieses Transporters schließen ließen (Hurbain et al., 2003; Kandimalla und Donovan, 2005; Wioland et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte nur in den Modellen mit HNF-Kokultur, sowohl kontaktlos als auch direkt im dreidimensionalen Modell, die mRNA von MRP4 und MRP5 mittels

PCR nachgewiesen werden. An dieser Stelle zeigt sich also ein deutlicher Vorteil der Kokulturen gegenüber der reinen Epithelzellkultur mit RPMI 2650. Ob diese mRNA-Expression mit einer gerichteten Expression der Transporterproteine einhergeht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Folgearbeiten werden sich zum einen mit dem Nachweis der Transporterproteine mittels immunhistochemischer Methoden und Western-Blotting, zum anderen mit dem Nachweis der Funktionalität der Transporter mittels Permeationsuntersuchungen beschäftigen.

6. Abschlussdiskussion

6.1. Modelle der nasalen Mukosa

Die nasale Applikation gewinnt immer mehr an Bedeutung, so dass auch ein Screening möglicher Arzneistoffe im Hinblick auf ihre nasale Bioverfügbarkeit immer wichtiger wird. Hierfür ist ein Modell wünschenswert, das schnell und einfach reproduzierbare Ergebnisse zur Permeation durch die nasale Mukosa liefert, die mit den Verhältnissen in vivo korrelieren.

Verschiedene Ansätze sind dazu in den letzten Jahrzehnten erprobt worden, insbesondere exzidiertes Gewebe, isolierte humane nasale Epithelzellen sowie immortalisierte Zelllinien (Dimova et al., 2005; Forbes und Ehrhardt, 2005; Merkle et al., 1998). Exzidiertes Gewebe ähnelt der physiologischen Situation am stärksten, während Zelllinien viele beispielsweise die Fähigkeit zur Zilienbildung verloren haben. Dagegen ist die Beschaffung, Kultivierung und Reproduzierbarkeit bei Zelllinien deutlich einfacher und besser.

Besonders isolierte humane nasale Epithelzellen in Primär- und Sekundärkultur sind weitgehend untersucht worden (Agu et al., 2001; Mallants et al., 2009; Sakakura, 1966; Werner und Kissel, 1995; Yeh et al., 2007; Yoo et al., 2003). Ihr Vorteil ist, dass sie beispielsweise Zilien ausbilden und Stoffwechselaktivität aufweisen. Jedoch ist auch hier die Beschaffung relativ aufwändig, und die Reproduzierbarkeit aufgrund der begrenzten Lebensdauer beschränkt.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit und zur Vereinfachung des Modellaufbaus bietet sich die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie an. Eine solche Zelllinie wie RPMI 2650 ist in ihrer Ähnlichkeit zur physiologischen Situation begrenzt, in früheren Untersuchungen wurde keine Zilienbildung und auch kein konfluentes Wachstum beobachtet (De Fraissinette et al., 1995a; Werner und Kissel, 1996). Dennoch wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, basierend auf der immortalisierten Zelllinie RPMI 2650 und humanen nasalen Fibroblasten Modelle des nasalen Epithels und der nasalen Mukosa aufzubauen, die reproduzierbare Ergebnisse liefern können. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der passiven Permeation, aber auch die Expression ausgewählter Transporter sollte untersucht werden.

6.2. Entwicklung und Charakterisierung epithelialer und dreidimensionaler Modelle

Um Epithelzellen zu einer weiteren Differenzierung anzuregen, erscheint es plausibel, ihnen mit Hilfe von Fibroblasten eine möglichst physiologische Umgebung zur Verfügung zu stellen. Isolierung und Kultivierung der humanen nasalen Fibroblasten war mit der Methode des Auswachsens erfolgreich. Es ist gelungen, humane nasale Fibroblasten zu gewinnen, die über mehrere Passagen kultivierbar und für weitere Versuche einsetzbar waren. Mikroskopisch war eindeutig die Morphologie spindelförmiger, langgezogener Fibroblasten zu erkennen. Entsprechende Methoden wurden bereits erfolgreich, z. B. bei cornealen Stromazellen (Reichl und Müller-Goymann, 2003), angewendet.

Ausgehend von den isolierten HNF und der Zelllinie RPMI 2650 wurden verschiedene epitheliale Modelle der nasalen Mukosa entwickelt und charakterisiert. Die Stimulierung der Differenzierung von Epithelzellen, wie auch von nasalen Zellen, durch Kontakt mit Luft ist bereits beschrieben worden (Lee et al., 2005; Lin et al., 2007a; Yeh et al., 2007). Für RPMI 2650 ist dies erst in einer jüngeren Studie von Bai et al. nachgewiesen worden (Bai et al., 2008). Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze stellte sich in der vorliegenden Arbeit als entscheidender Faktor zur Ausbildung eines konfluenten Multilayers von 10-15 Zellschichten heraus, der ausgehend von der untersten Zellschicht hin zur obersten mit direktem Luftkontakt einen geringen Grad an Differenzierung aufwies. Obwohl die Ergebnisse einiger früherer Publikationen gegen eine Eignung dieser Zelllinie für Permeationsuntersuchungen sprechen (De Fraissinette et al., 1995a; Werner und Kissel, 1996), ist es also gelungen, ein konfluentes Modell zu entwickeln.

Um durch die direkte Kokultur von Fibroblasten und Epithelzellen die Differenzierung in eine adäquate Permeationsbarriere zu fördern, wurde zusätzlich zum rein epithelialen Modell ausgehend von den HNF- und RPMI 2650-Zellen ein dreidimensionales organotypisches Gewebeäquivalent entwickelt. Diese Art Modell ist für andere Gewebe bereits erfolgreich etabliert worden.

Mikroskopisch zeigte sich auf dem Kollagengel mit inkorporierten Fibroblasten ein mehrschichtiges Epithel wie beim epithelialen Modell, welches allerdings nicht der Morphologie des respiratorischen Epithels entsprach. Zilien wurden nicht ausgebildet.

Zur Charakterisierung der Modelle wurden neben TEER-Messungen insbesondere Permeationsuntersuchungen durchgeführt. Hierfür ist es erforderlich, sowohl die parazelluläre als auch die transzelluläre Permeation mit Hilfe von Modellstoffen zu untersuchen. Zusätzlich erscheint es sinnvoll, einen Modellstoff mit hohem Molekulargewicht zu verwenden, da die intranasale Applikation auch für Proteine ein vielversprechender Weg ist.

Sowohl für den transepithelialen elektrischen Widerstand als auch für die parazelluläre Permeation mit Natrium-Fluorescein, für die transzelluläre Permeation mit Propranolol-HCl sowie die Permeation eines Makromoleküls (FD4) zeigte sich, dass das hier entwickelte epitheliale Modell organotypische Barriereigenschaften aufweist. Insbesondere bei der parazellulären Permeation ergaben sich im Vergleich zu beschriebenen HNE-Modellen deutliche Vorteile. Letztere ergaben weitaus niedrigere Permeationskoeffizienten und höhere TEER-Werte als die in dieser Arbeit gemessenen für humane nasale Mukosa, während das epitheliale RPMI 2650-Modell die physiologischen Verhältnisse wesentlich besser nachbildete (Lee et al., 2005; Yoo et al., 2003). Auch das hier entwickelte dreidimensionale Modell weist organotypische Barriereigenschaften auf, wobei jedoch die Permeationskoeffizienten gegenüber dem epithelialen Modell leicht erhöht sind. Optimierungsbedarf besteht noch hinsichtlich der mechanischen Festigkeit der Modelle.

Für die Bioverfügbarkeit nasal applizierter Arzneistoffe ist neben der passiven Permeation auch der aktive Transport vor allem durch ABC-Transporter von Bedeutung. Daher wurde die mRNA-Expression ausgewählter ABC-Transporter in den Modellen untersucht. Eine mögliche Expression von MDR1 (ABCB1) wurde einerseits indirekt durch die Permeation des Substrates Rhodamin 123 bestimmt. Bei dieser Permeationsuntersuchung konnte keine gerichtete Expression festgestellt werden. Mittels PCR wurde dann andererseits direkt die Expression der mRNA der Transporter MDR1 sowie MRP1-5 (ABCC1-5) und CFTR (ABCC7) untersucht. Nur in den Kokulturen wurden MRP4 und 5 nachweisbar exprimiert, die in früheren Publikationen in exzidierte nasale Mukosa in hohem Maße nachgewiesen worden sind (Hurbain et al., 2003; Wioland et al., 2000).

Insbesondere die Expression von MRP4 und MRP5 stellte also in der vorliegenden Arbeit einen Vorteil der dreidimensionalen Modelle bzw. der Kokulturen beider Zellarten gegenüber dem reinen Epithelmodell dar. Ob diese mRNA-Expression mit

einer gerichteten Expression der Transporterproteine einhergeht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der Nachweis der Transporterproteine mittels immunhistochemischer Methoden und Western-Blotting sowie der Nachweis der Funktionalität der Transporter mittels Permeationsuntersuchungen sind hier für vertiefende Arbeiten von großem Interesse.

6.3. Intraindividuelle Schwankungen der Permeation

Die Annahme, dass innerhalb der Nasenhöhle bei ein und derselben Person nachweisbare Unterschiede in der mukosalen Permeabilität bestehen, beruht auf der ungleichmäßigen Verteilung der unterschiedlichen Zellarten innerhalb der Nasenhöhle (Dahl und Mygind, 1998). Diese Unterschiede sollten anhand von Schweinenasenschleimhaut untersucht werden. Unterschiede der Permeabilität innerhalb der Nasenhöhle könnten bei der Applikation verschiedener Darreichungsformen massiven Einfluss auf die Bioverfügbarkeit haben, je nachdem, welchen Bereich der Nasenschleimhaut der Arzneistoff erreicht.

Am Modell der porcinen nasalen Mukosa, die von verschiedenen Entnahmeorten in der Nasenhöhle bzw. von den Nasenmuscheln stammte, konnten Unterschiede in den TEER-Werten sowie in der parazellulären Permeabilität gezeigt werden. Ausgehend von den beschriebenen Verteilungsmustern der verschiedenen Zelltypen in humaner nasaler Mukosa (Carson et al., 1987; Dahl und Mygind, 1998; Inagaki et al., 1985) und ihrer unterschiedlichen Fähigkeit zur Bildung von Tight Junctions war die Erwartung folgende: Die Mukosa aus dem hinteren Bereich der Nasenhöhle könnte dichter sein, und die Werte der Proben aus dem oberen Bereich könnten geringere Schwankungen aufweisen. Diese Erwartungen wurden aber nicht bestätigt. Allerdings zeigten sich durchaus unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen Gebiete. Die Proben teilten sich tendenziell in zwei Gruppen auf. Im Mittel waren sowohl die TEER-Werte als auch die Permeationskoeffizienten des parazellulären Modellstoffes denen in humaner Mukosa gemessenen sehr ähnlich.

Proben aus dem oberen Bereich der Nasenmuscheln sowie von der Nasenscheidewand waren deutlich weniger permeabel als beispielsweise Proben von der äußeren Wand der Nasenhöhle. Intraindividuelle Schwankungen konnten also gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass auch beim Menschen entsprechende Schwankungen möglich sein können, wobei die Verteilung der dichteren und der permeableren Gebiete von den Gegebenheiten beim Schwein

abweichen könnte. Für die nasale Applikation von systemisch wirksamen Stoffen bedeutet dies eine Herausforderung. Zwar kann man in der Entwicklung der Applikationsform gezielt besser permeable Gebiete ansteuern, gleichzeitig aber muss man sicherstellen, dass bei jeder Anwendung die gleichen Areale der Mukosa erreicht werden, um eine gleichbleibende Bioverfügbarkeit zu gewährleisten.

7. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein organotypisches Permeationsmodell der humanen nasalen Mukosa zu entwickeln, wobei zunächst die passive parazelluläre und transzelluläre Permeation im Vordergrund stand. Hierfür wurden Untersuchungen sowohl mit isolierten humanen nasalen Epithelzellen in Primärkultur als auch mit der immortalisierten Zelllinie RPMI 2650 sowie mit exzidierter humaner Mukosa durchgeführt. Um den Einfluss einer Kokultur mit Fibroblasten untersuchen zu können, sollten humane nasale Fibroblasten (HNF) isoliert und kultiviert werden, die dann in kontaktlosen Modellen und dreidimensionalen Modellen mit direktem Kontakt zu den Epithelzellen eingesetzt wurden.

Darauf aufbauend sollte dann die mRNA-Expression verschiedener Efflux-Transporter und deren Einfluss auf die aktive Permeation eines Modellsubstrates in den verschiedenen Modellen charakterisiert werden.

Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit die Barriereigenschaften der nasalen Mukosa abhängig vom Entnahmeort in der Nasenhöhle schwanken. Hierfür wurde porcine Mukosa verwendet.

Eine Kultivierung humaner nasaler Epithelzellen in Primärkultur war in dieser Arbeit nicht erfolgreich, daher wurde der Fokus auf die immortalisierte humane Zelllinie RPMI 2650 gesetzt.

Verschiedene Modelle wurden entwickelt. Zunächst wurde ein einfaches Epithelmodell aus reinen RPMI 2650-Zellen auf einem Transwell-Filtereinsatz aufgebaut. Dieses Epithelmodell wurde zusätzlich in einer kontaktlosen Kokultur mit humanen nasalen Fibroblasten kultiviert. Daneben wurde ein dreidimensionales Konstrukt aufgebaut, das aus einem Kollagengel mit inkorporierten HNF und darauf aufgesäten Epithelzellen bestand, die in direktem Kontakt miteinander standen.

Zur Charakterisierung der verschiedenen Modelle wurden zunächst Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes durchgeführt, um die Funktionalität der ausgeprägten Barriere einschätzen zu können. Hierbei zeigte sich bereits die entscheidende Bedeutung der Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze. Durch diese Kultivierungsmethode konnten RPMI 2650-Zellen, die sonst nicht konfluent wuchsen, zur Ausprägung eines konfluenten Multilayers mit Differenzierungsansätzen angeregt werden.

Permeationsuntersuchungen mit einem parazellulären und einem transzellulären Marker sowie einem Makromolekül ergaben, dass die entwickelten Modelle mit RPMI 2650 geeignete In vitro-Modelle für die passive Permeation durch die humane nasale Mukosa darstellen. Sie zeigten insbesondere bessere organotypische Barriereigenschaften als die häufig verwendeten humanen nasalen Epithelzellen. Letztere wiesen in Kultur eine sehr hohe Barrierefunktion im Vergleich mit exzidierte Mukosa auf, während die hier entwickelten Modelle den physiologischen Barriereigenschaften wesentlich näher kamen.

Mittels PCR wurde die mRNA-Expression der ABC-Transporter MDR1, MRP1-5 und CFTR in den verschiedenen Modellen untersucht. Hierbei zeigte sich ein Vorteil der Kokulturen mit HNF gegenüber den reinen Epithelmodellen. Kokulturen wiesen eine stärkere Expression der Transporter auf, die gemäß Literaturangaben auch in nasaler Mukosa am stärksten exprimiert werden.

Um intraindividuelle Unterschiede in der Permeabilität der Mukosa, je nach Lage in der Nasenhöhle, beurteilen zu können, wurde die exzidierte porcine Mukosa aus verschiedenen Bereichen der Nasenhöhle mittels TEER-Messungen und parazellulärer Permeation charakterisiert. Hierbei erwiesen sich Proben aus dem oberen Bereich der Nasenhöhle und von der Nasenscheidewand als weniger permeabel. Diese Ergebnisse sind zwar nicht direkt auf humane Mukosa übertragbar, lassen aber vermuten, dass es auch beim Menschen intraindividuelle Unterschiede in den Permeationseigenschaften der Mukosa geben könnte. Dies ist für die Entwicklung von nasalen Applikationsformen ein wichtiger Aspekt.

In dieser Arbeit ist es gelungen, ein einfach zu kultivierendes, reproduzierbares Modell der humanen nasalen Mukosa für Permeationsuntersuchungen zu entwickeln. Die Ergebnisse sprechen für organotypische Eigenschaften bei der passiven Permeation hydrophiler und lipophiler Stoffe und von Stoffen mit hohem Molekulargewicht. Die Expression der angesprochenen ABC-Transporter ist auf Protein- und Funktionalitätsebene noch weiter zu charakterisieren. Als Nachteile des Modells sind fehlende Stoffwechselaktivität, Zilienbildung und mukoziliäre Clearance der nasalen Mukosa zu nennen. Dennoch erscheinen sowohl das reine Epithelmodell der Zelllinie RPMI 2650 als auch das dreidimensionale Modell für Permeations-Screenings als Alternative zur Verwendung von exzidierte Mukosa oder isolierten

humanen nasalen Epithelzellen bzw. den daraus aufgebauten Epithelmodellen gut geeignet.

8. Literaturverzeichnis

- Agu, R.U., Jorissen, M., Willems, T., Augustijns, P., Kinget, R., Verbeke, N., 2001. In-vitro nasal drug delivery studies: comparison of derivatised, fibrillar and polymerised collagen matrix-based human nasal primary culture systems for nasal drug delivery studies. *J Pharm Pharmacol* 53, 1447-1456.
- Agu, R.U., Ugwoke, M.I., 2008. In Situ and Ex Vivo Nasal Models for Preclinical Drug Development Studies. In: Ehrhardt, C., Kim, K.J. (Eds.), *Drug Absorption Studies*. Springer Science + Business Media, New York, pp. 112-134.
- Agu, R.U., Valiveti, S., Earles, D.C., Klausner, M., Hayden, P.J., Wermeling, D.P., Stinchcomb, A.L., 2004. Intranasal delivery of recombinant human parathyroid hormone [hPTH (1-34)], teriparatide in rats. *Endocr Res* 30, 455-467.
- Bai, S., Yang, T., Abbruscato, T.J., Ahsan, F., 2008. Evaluation of human nasal RPMI 2650 cells grown at an air-liquid interface as a model for nasal drug transport studies. *J Pharm Sci* 97, 1165-1178.
- Behl, C.R., Romeo, V.D., deMeireles, J., Sileno, A.P., Pimplaskar, H.K., 1998. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 89-116.
- Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C., 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1274-1278.
- Bucher, O., Wartenberg, H., 1997. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*, 12 ed. Huber Verlag, Göttingen.
- Carson, J.L., Collier, A.M., Boucher, R.C., 1987. Ultrastructure of the epithelium in the human nose. In: Mygind, N., Pipkorn, U. (Eds.), *Allergic and Vasomotor Rhinitis. Pathophysiological Aspects*. Munksgaard, Copenhagen, pp. 11-27.
- Chen, S.C., Eiting, K., Cui, K., Leonard, A.K., Morris, D., Li, C.Y., Farber, K., Sileno, A.P., Houston, M.E., Jr., Johnson, P.H., Quay, S.C., Costantino, H.R., 2006. Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery. *J Pharm Sci* 95, 1364-1371.
- Cho, D.Y., Hajighasemi, M., Hwang, P.H., Illek, B., Fischer, H., 2009. Proton secretion in freshly excised sinonasal mucosa from asthma and sinusitis patients. *Am J Rhinol Allergy* 23, e10-13.

- Cho, H.J., Balakrishnan, P., Shim, W.S., Chung, S.J., Shim, C.K., Kim, D.D., 2010. Characterization and in vitro evaluation of freeze-dried microparticles composed of granisetron-cyclodextrin complex and carboxymethylcellulose for intranasal delivery. *Int J Pharm* 400, 59-65.
- Constantinidis, J., Knobber, D., Steinhart, H., Kuhn, J., Iro, H., 2000. [Morphological and functional changes in nasal mucosa after nCPAP therapy]. *HNO* 48, 747-752.
- Costantino, H.R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P.H., Quay, S.C., 2007. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm* 337, 1-24.
- Cotton, C.U., Stutts, M.J., Knowles, M.R., Gatzky, J.T., Boucher, R.C., 1987. Abnormal apical cell membrane in cystic fibrosis respiratory epithelium. An in vitro electrophysiologic analysis. *J Clin Invest* 79, 80-85.
- Dahl, R., Mygind, N., 1998. Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 3-12.
- De Fraissinette, A., Brun, R., Felix, H., Vonderscher, J., Rummelt, A., 1995a. Evaluation of the human cell line RPMI 2650 as an in vitro nasal model. *Rhinology* 33, 194-198.
- de Fraissinette, A., Kolopp, M., Schiller, I., Fricker, G., Gammert, C., Pospischil, A., Vonderscher, J., Richter, F., 1995b. In vitro tolerability of human nasal mucosa: histopathological and scanning electron-microscopic evaluation of nasal forms containing Sandostatin. *Cell Biol Toxicol* 11, 295-301.
- Deterding, R.R., Jacoby, C.R., Shannon, J.M., 1996. Acidic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor stimulate fetal rat pulmonary epithelial growth. *Am J Physiol* 271, L495-505.
- Di Colo, G., Zambito, Y., Zaino, C., 2008. Polymeric enhancers of mucosal epithelia permeability: synthesis, transepithelial penetration-enhancing properties, mechanism of action, safety issues. *J Pharm Sci* 97, 1652-1680.
- Dimova, S., Brewster, M.E., Noppe, M., Jorissen, M., Augustijns, P., 2005. The use of human nasal in vitro cell systems during drug discovery and development. *Toxicol In Vitro* 19, 107-122.
- Donovan, M.D., Flynn, G.L., Amidon, G.L., 1990. The molecular weight dependence of nasal absorption: the effect of absorption enhancers. *Pharm Res* 7, 808-815.
- Duan, X., Mao, S., 2010. New strategies to improve the intranasal absorption of insulin. *Drug Discov Today* 15, 416-427.

- Ehrhardt, C., 2003. Characterisation of epithelial cell culture models of the lung for in vitro studies of pulmonary drug delivery. Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
- Ehrhardt, C., Kneuer, C., Laue, M., Schaefer, U.F., Kim, K.J., Lehr, C.M., 2003. 16HBE14o- human bronchial epithelial cell layers express P-glycoprotein, lung resistance-related protein, and caveolin-1. *Pharm Res* 20, 545-551.
- el-Ghalbzouri, A., Gibbs, S., Lamme, E., Van Blitterswijk, C.A., Ponc, M., 2002. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol* 147, 230-243.
- Endres, M., 2005. Entwicklung eines bioartifiziellen Trachealersatzes: Charakterisierung humaner respiratorischer Epithelzellen in Expansions- und Differenzierungskulturen. Medizinische Fakultät der Charité, Berlin.
- England, R.J., Homer, J.J., Knight, L.C., Ell, S.R., 1999. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 24, 67-68.
- Fisher, A.N., Brown, K., Davis, S.S., Parr, G.D., Smith, D.A., 1987. The effect of molecular size on the nasal absorption of water-soluble compounds in the albino rat. *J Pharm Pharmacol* 39, 357-362.
- Flynn, G.L., Yalkowsky, S.H., Roseman, T.J., 1974. Mass transport phenomena and models: theoretical concepts. *J Pharm Sci* 63, 479-510.
- Forbes, B., Ehrhardt, C., 2005. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm* 60, 193-205.
- Gray, T.E., Guzman, K., Davis, C.W., Abdullah, L.H., Nettesheim, P., 1996. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 104-112.
- Grubb, B.R., Rogers, T.D., Diggs, P.C., Boucher, R.C., Ostrowski, L.E., 2006. Culture of murine nasal epithelia: model for cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L270-277.
- Hamilton, K.O., Topp, E., Makagiansar, I., Siahaan, T., Yazdanian, M., Audus, K.L., 2001. Multidrug resistance-associated protein-1 functional activity in Calu-3 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 1199-1205.
- Harikarnpakdee, S., Lipipun, V., Sutanthavibul, N., Ritthidej, G.C., 2006. Spray-dried mucoadhesive microspheres: preparation and transport through nasal cell monolayer. *AAPS PharmSciTech* 7, E12.

- Henriksson, G., Norlander, T., Zheng, X., Stierna, P., Westrin, K.M., 1997. Expression of P-glycoprotein 170 in nasal mucosa may be increased with topical steroids. *Am J Rhinol* 11, 317-321.
- Hoffmann, C., 2006. Charakterisierung organotypischer Hautmodelle für In-vitro-Permeationsuntersuchungen. Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig.
- Huang, Y., Donovan, M.D., 1998. Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 147-155.
- Hurbain, I., Sermet-Gaudelus, I., Vallee, B., Feuillet, M.N., Lenoir, G., Bernaudin, J.F., Edelman, A., Fajac, A., 2003. Evaluation of MRP1-5 gene expression in cystic fibrosis patients homozygous for the delta F508 mutation. *Pediatr Res* 54, 627-634.
- Illum, L., 2003. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 87, 187-198.
- Inagaki, M., Sakakura, Y., Itoh, H., Ukai, K., Miyoshi, Y., 1985. Macromolecular permeability of the tight junction of the human nasal mucosa. *Rhinology* 23, 213-221.
- Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 455, 152-162.
- Kandimalla, K.K., Donovan, M.D., 2005. Localization and differential activity of P-glycoprotein in the bovine olfactory and nasal respiratory mucosae. *Pharm Res* 22, 1121-1128.
- Karasulu, E., Yavasoglu, A., Evrensan, Z., Uyanikgil, Y., Karasulu, H.Y., 2008. Permeation studies and histological examination of sheep nasal mucosa following administration of different nasal formulations with or without absorption enhancers. *Drug Deliv* 15, 219-225.
- Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V., 1983. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221, 1285-1288.
- Kissel, T., Werner, U., 1998. Nasal delivery of peptides: an in vitro cell culture model for the investigation of transport and metabolism in human nasal epithelium. *J Control Release* 53, 195-203.
- Koch, A.M., Schmidt, M.C., Merkle, H.P., 2002. In vitro methodologies to study nasal delivery using excised mucosa. In: Lehr, C.M. (Ed.), *Cell Culture Models of Biological Barriers*. Taylor & Francis, London, pp. 228-252.

- Koizumi, J., Kojima, T., Kamekura, R., Kurose, M., Harimaya, A., Murata, M., Osanai, M., Chiba, H., Himi, T., Sawada, N., 2007. Changes of gap and tight junctions during differentiation of human nasal epithelial cells using primary human nasal epithelial cells and primary human nasal fibroblast cells in a noncontact coculture system. *J Membr Biol* 218, 1-7.
- Kubo, H., Hosoya, K., Natsume, H., Sugibayashi, K., Morimoto, Y., 1994. In vitro permeation of several model drugs across rabbit nasal mucosa. *Int J Pharm* 103, 27-36.
- Kumar, V.H., Lakshminrusimha, S., El Abiad, M.T., Chess, P.R., Ryan, R.M., 2005. Growth factors in lung development. *Adv Clin Chem* 40, 261-316.
- Langmann, T., Mauerer, R., Zahn, A., Moehle, C., Probst, M., Stremmel, W., Schmitz, G., 2003. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 49, 230-238.
- Le Visage, C., Dunham, B., Flint, P., Leong, K.W., 2004. Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa. *Tissue Eng* 10, 1426-1435.
- Lee, M.K., Yoo, J.W., Lin, H., Kim, Y.S., Kim, D.D., Choi, Y.M., Park, S.K., Lee, C.H., Roh, H.J., 2005. Air-liquid interface culture of serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Drug Deliv* 12, 305-311.
- Lee, V.H., Yamamoto, A., Kompella, U.B., 1991. Mucosal penetration enhancers for facilitation of peptide and protein drug absorption. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 8, 91-192.
- Leonard, A.K., Sileno, A.P., MacEvilly, C., Foerder, C.A., Quay, S.C., Costantino, H.R., 2005. Development of a novel high-concentration galantamine formulation suitable for intranasal delivery. *J Pharm Sci* 94, 1736-1746.
- Lin, C.F., Tsai, C.H., Cheng, C.H., Chen, Y.S., Tournier, F., Yeh, T.H., 2007a. Expression of Toll-like receptors in cultured nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 127, 395-402.
- Lin, H., Gebhardt, M., Bian, S., Kwon, K.A., Shim, C.K., Chung, S.J., Kim, D.D., 2007b. Enhancing effect of surfactants on fexofenadine.HCl transport across the human nasal epithelial cell monolayer. *Int J Pharm* 330, 23-31.

- Mallants, R., Jorissen, M., Augustijns, P., 2007. Effect of preservatives on ciliary beat frequency in human nasal epithelial cell culture: single versus multiple exposure. *Int J Pharm* 338, 64-69.
- Mallants, R., Vlaeminck, V., Jorissen, M., Augustijns, P., 2009. An improved primary human nasal cell culture for the simultaneous determination of transepithelial transport and ciliary beat frequency. *J Pharm Pharmacol* 61, 883-890.
- MatTek, 11/2008. The EpiAirway™ Tissue Model. MatTek Corporation.
- Merkle, H.P., Ditzinger, G., Lang, S.R., Peter, H., Schmidt, M.C., 1998. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 51-79.
- Moll, R., Krepler, R., Franke, W.W., 1983. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation* 23, 256-269.
- Moore, G.E., Sandberg, A.A., 1964. Studies of a Human Tumor Cell Line with a Diploid Karyotype. *Cancer* 17, 170-175.
- Moorhead, P.S., 1965. Human tumor cell line with a quasi-diploid karyotype (RPMI 2650). *Exp Cell Res* 39, 190-196.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Muranishi, S., 1990. Absorption enhancers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 7, 1-33.
- Nakamura, K., Maitani, Y., Takayama, K., 2002. The enhancing effect of nasal absorption of FITC-dextran 4,400 by beta-sitosterol beta-D-glucoside in rabbits. *J Control Release* 79, 147-155.
- Ohji, M., SundarRaj, N., Hassell, J.R., Thoft, R.A., 1994. Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 479-485.
- Peter, H.G., 1996. Cell culture sheets to study nasal peptide metabolism: the human nasal RPMI 2650 cell line model. ETH, Zürich.
- Reichl, S., 2003. Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen. Technische Universität Carolo Wilhelmina, Braunschweig.
- Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2003. The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm* 250, 191-201.

- Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., Ling, V., 1985. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316, 817-819.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J., 1998. Primer 3. Whitehead Institute for Biomedical Research.
- Rubin, D.C., 2007. Intestinal morphogenesis. *Curr Opin Gastroenterol* 23, 111-114.
- Sakakura, Y., 1966. A study of ciliary activity in culture of adult human nasal mucosa. *Mie Med J* 15, 211-229.
- Salib, R.J., Lau, L.C., Howarth, P.H., 2005. The novel use of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 as an in vitro model to study the influence of allergens and cytokines on transforming growth factor-beta gene expression and protein release. *Clin Exp Allergy* 35, 811-819.
- Schmidt, D., Hubsch, U., Wurzer, H., Heppt, W., Aufderheide, M., 1996. Development of an in vitro human nasal epithelial (HNE) cell model. *Toxicol Lett* 88, 75-79.
- Schmidt, M.C., Simmen, D., Hilbe, M., Boderke, P., Ditzinger, G., Sandow, J., Lang, S., Rubas, W., Merkle, H.P., 2000. Validation of excised bovine nasal mucosa as in vitro model to study drug transport and metabolic pathways in nasal epithelium. *J Pharm Sci* 89, 396-407.
- Steele, V.E., Arnold, J.T., 1985. Isolation and long-term culture of rat, rabbit, and human nasal turbinate epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 21, 681-687.
- Toropainen, E., Ranta, V.P., Talvitie, A., Suhonen, P., Urtti, A., 2001. Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2942-2948.
- Turker, S., Onur, E., Ozer, Y., 2004. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci* 26, 137-142.
- Uchida, N., Y. Maitani, Y. Machida, M. Nakagaki, T. Nagai, 1991. Influence of bile salts on the permeability of insulin through the nasal mucosa of rabbits in comparison with dextran derivatives. *Int J Pharm* 74, 95-103.
- Ugwoke, M.I., Verbeke, N., Kinget, R., 2001. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J Pharm Pharmacol* 53, 3-21.
- Wadell, C., Bjork, E., Camber, O., 1999. Nasal drug delivery--evaluation of an in vitro model using porcine nasal mucosa. *Eur J Pharm Sci* 7, 197-206.

- Wadell, C., Bjork, E., Camber, O., 2003. Permeability of porcine nasal mucosa correlated with human nasal absorption. *Eur J Pharm Sci* 18, 47-53.
- Warren, M.S., Zerangue, N., Woodford, K., Roberts, L.M., Tate, E.H., Feng, B., Li, C., Feuerstein, T.J., Gibbs, J., Smith, B., de Moraes, S.M., Dower, W.J., Koller, K.J., 2009. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res* 59, 404-413.
- Werner, S., Smola, H., 2001. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* 11, 143-146.
- Werner, U., Kissel, T., 1995. Development of a human nasal epithelial cell culture model and its suitability for transport and metabolism studies under in vitro conditions. *Pharm Res* 12, 565-571.
- Werner, U., Kissel, T., 1996. In-vitro cell culture models of the nasal epithelium: a comparative histochemical investigation of their suitability for drug transport studies. *Pharm Res* 13, 978-988.
- Wiesel, J.M., Gamiel, H., Vlodavsky, I., Gay, I., Ben-Bassat, H., 1983. Cell attachment, growth characteristics and surface morphology of human upper-respiratory tract epithelium cultured on extracellular matrix. *Eur J Clin Invest* 13, 57-63.
- Wioland, M.A., Fleury-Feith, J., Corlieu, P., Commo, F., Monceaux, G., Lacau-St-Guily, J., Bernaudin, J.F., 2000. CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. *J Histochem Cytochem* 48, 1215-1222.
- Wiszniewski, L., Jornot, L., Dudez, T., Pagano, A., Rochat, T., Lacroix, J.S., Suter, S., Chanson, M., 2006. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34, 39-48.
- Yamamoto, A., Iseki, T., Ochi-Sugiyama, M., Okada, N., Fujita, T., Muranishi, S., 2001. Absorption of water-soluble compounds with different molecular weights and. *J Control Release* 76, 363-374.
- Yeh, T.H., Tsai, C.H., Chen, Y.S., Hsu, W.C., Cheng, C.H., Hsu, C.J., Lee, S.Y., 2007. Increased communication among nasal epithelial cells in air-liquid interface culture. *Laryngoscope* 117, 1439-1444.

-
- Yoo, J.W., Kim, Y.S., Lee, S.H., Lee, M.K., Roh, H.J., Jhun, B.H., Lee, C.H., Kim, D.D., 2003. Serially passaged human nasal epithelial cell monolayer for in vitro drug transport studies. *Pharm Res* 20, 1690-1696.